

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.141

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT PHÂN HỦY PHENOL TỪ MẪU Bùn KHU CHỨA NƯỚC THẢI PHÒNG THÍ NGHIỆM THUỘC KHOA NÔNG NGHIỆP, TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ

Đỗ Thành Luân¹, Trần Hoàng Ty², Trần Võ Hải Đường³ và Nguyễn Khởi Nghĩa^{1*}

¹Bộ Môn Khoa học Đất, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Học viên cao học ngành Sinh thái học, Khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật tỉnh Bạc Liêu

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Khởi Nghĩa (email: nknghia@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 16/07/2020

Ngày nhận bài sửa: 25/09/2020

Ngày duyệt đăng: 28/12/2020

Title:

Isolation and selection of phenol degrading microorganisms from sludge of the laboratory wastewater discharge area, College of Agriculture, Can Tho University

Từ khóa:

28S-rRNA, *Candida tropicalis*, phân hủy sinh học, phenol

Keywords:

28S-rRNA, biodegradation, *Candida tropicalis*, phenol

ABSTRACT

The aim of the study was to isolate microorganisms able to biodegrade phenol compound from mud samples of the laboratory wastewater discharge area in College of Agriculture, Can Tho University. Two mud samples of laboratorial discharge area and one soil sample of grass at College of Agriculture, Can Tho University were enriched in the liquid minimal salt medium (MSM) containing 500 mg.L⁻¹ phenol for enhancement of microbial density. The phenol concentration in liquid medium was determined by colorimetric method with Folin - Ciocalteu's phenol reagent at wavelength 758 nm. The results showed that all the three microbial communities studied were able to biodegrade highly phenol compound in the liquid MSM and varied from 87.6% to 91.5% of the total initial concentration after 5 incubation days. Two yeast strains labeled as PS1.1 and PS6 among 28 microbial isolates showed their high biodegradation of phenol compound in liquid MSM containing 500 mg.L⁻¹ phenol with a degradation percentage of 98.9% and 97.6%, respectively after 5 incubation days. Based on 28S-rRNA gene sequences, these two yeast strains showed 100% identity with *Candida tropicalis* and they were identified as *Candida tropicalis* PS1.1 and *Candida tropicalis* PS6, respectively.

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm phân lập vi sinh vật có khả năng phân hủy phenol từ mẫu bùn khu chứa nước thải phòng thí nghiệm thuộc Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Hai mẫu bùn khu chứa nước thải phòng thí nghiệm và một mẫu đất cỏ thuộc Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ được nuôi tăng sinh trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L⁻¹ phenol để nhân mật số vi sinh vật. Nồng độ phenol trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp so màu với thuốc thử Folin - Ciocalteu's phenol ở bước sóng 758 nm. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả ba hệ vi sinh vật từ mẫu bùn và mẫu đất đều có khả năng phân hủy phenol cao và dao động trong khoảng từ 87,6% đến 91,5% sau 5 ngày nuôi cấy. Hai dòng nấm men ký hiệu PS1.1 và PS6 trong số 28 dòng vi khuẩn và nấm men phân lập được có khả năng phân hủy phenol rất cao trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L⁻¹ phenol với phần trăm phân hủy lần lượt đạt 98,9% và 97,6% sau 5 ngày nuôi cấy. Kết quả giải trình tự đoạn gen 28S-rRNA cho thấy cả 2 dòng PS1.1 và PS6 có độ tương đồng 100% với loài nấm men *Candida tropicalis* và được định danh là *Candida tropicalis* PS1.1 và *Candida tropicalis* PS6.

Trích dẫn: Đỗ Thành Luân, Trần Hoàng Ty, Trần Võ Hải Đường và Nguyễn Khởi Nghĩa, 2020. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân hủy phenol từ mẫu bùn khu chứa nước thải phòng thí nghiệm thuộc Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(6A): 33-41.

1 GIỚI THIỆU

Phenol (C_6H_5OH) là một hợp chất vòng thơm có độ độc cao, khó phân hủy, lưu tồn lâu trong môi trường đất, ảnh hưởng đến môi trường, động thực vật thủy sinh và đặc biệt nguy hiểm cho sức khỏe con người (Lika and Papadakis, 2009). Tiếp xúc cấp tính với phenol gây kích ứng da, phenol độc hại đối với hệ thần kinh, tim, thận, gan và dễ dàng hấp thu qua da và niêm mạc (Wang *et al.*, 2011). Tuy nhiên, ngày nay phenol và các hợp chất của nó được sử dụng rất nhiều trong lĩnh vực công nghiệp, ngoài ra phenol còn được sử dụng phổ biến trong các phòng thí nghiệm nhằm phục vụ cho nghiên cứu và giảng dạy. Việc lưu tồn của phenol trong nước thải công nghiệp như nhà máy lọc dầu, được phẩm, dầu khí, dệt may và nước thải từ các phòng thí nghiệm sẽ dẫn đến ô nhiễm nguồn nước, đất và trầm tích ở xung quanh các khu vực này nếu không được xử lý trước khi xả thải ra môi trường. Do đó, việc xử lý nhằm loại bỏ dư lượng phenol ra khỏi nguồn nước thải, đất và trầm tích ô nhiễm với phenol là rất cần thiết (Pradeep *et al.*, 2015). Hiện nay, biện pháp sinh học thông qua việc sử dụng vi sinh vật (VSV) có khả năng phân hủy phenol cao nhằm xử lý ô nhiễm phenol lưu tồn trong nước, đất và trầm tích là một trong những biện pháp xử lý phenol được ưu tiên lựa chọn vì có hiệu quả cao, tiết kiệm và thân thiện với môi trường sinh thái. Nhiều nghiên cứu trước đây trên thế giới cho thấy một số loài vi khuẩn và nấm men như *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp., (Kafilzadeh and Mokhtari, 2013) *Candida tropicalis* (Jiang *et al.*, 2018), *Cryptococcus terreus*, *Rhodotorula creatinivora* (Krallish *et al.*, 2006) phân lập có khả năng phân hủy phenol cao và được ứng dụng rộng rãi trong xử lý ô nhiễm phenol. Tuy nhiên, ở Việt Nam, các nghiên cứu về phân lập các vi sinh vật mà đặc biệt là nấm men có khả năng phân hủy phenol và ứng dụng chúng trong xử lý môi trường đất, nước và trầm tích ô nhiễm với phenol còn rất hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu phân lập, tuyển chọn và định danh dòng VSV có khả năng phân hủy phenol cao từ mẫu bùn ao chứa nước thải từ phòng thí nghiệm và mẫu đất trồng cỏ.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguồn vi sinh vật

Hai mẫu bùn được dùng trong phân lập VSV có khả năng phân hủy phenol được thu thập tại ao khu chứa nước xả thải Phòng thí nghiệm Hóa học đất và Phòng thí nghiệm Sinh học đất trong thời gian dài và một mẫu đất trồng cỏ thuộc khuôn viên Khoa

Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Mẫu bùn và đất được lấy ngẫu nhiên ở độ sâu 0-20 cm bằng khoan lấy mẫu, sau đó mẫu được cho vào các chai thủy tinh 250 mL vô trùng và trữ trong tủ lạnh để phục vụ cho quá trình phân lập.

2.2 Làm giàu mật số VSV có khả năng phân hủy phenol trong hệ VSV và đánh giá khả năng phân hủy phenol của hệ VSV

2.2.1 Làm giàu mật số vi sinh vật có khả năng phân hủy phenol trong hệ vi sinh vật

Một lượng mẫu bùn hoặc đất (5 g) chứa VSV được cho vào trong bình tam giác 100 mL chứa 50 mL môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L⁻¹ phenol được tiệt trùng. Tiếp theo, các bình tam giác nuôi cấy được đặt trên máy lắc với tốc độ 110 vòng.phút⁻¹ ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm và trong tối. Sau 7 ngày nuôi cấy, 1 mL dung dịch VSV của thể hệ nuôi cấy đầu tiên được chuyển vào bình tam giác khác chứa 49 mL dung dịch môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L⁻¹ phenol tiệt trùng. Mẫu được tiếp tục nuôi cấy trên máy lắc, trong tối và trong điều kiện phòng thí nghiệm trong 7 ngày. Sau đó, 1 mL dịch vi khuẩn của thể hệ nuôi cấy thứ hai được chuyển vào bình tam giác khác chứa 49 mL dung dịch môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L⁻¹ phenol tiệt trùng và được nuôi trên máy lắc. Toàn bộ qui trình được lặp lại liên tục trong 5 lần. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không cho mẫu bùn hoặc đất vào bình chứa môi trường nuôi cấy. Thành phần của môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol (mineral-based culture) gồm: MnSO₄.H₂O 0,01 g; MgSO₄ 0,1 g; NaCl 0,1 g; KH₂PO₄ 0,2 g; K₂HPO₄ 0,4 g; phenol 0,5 g; (NH₄)₂SO₄ 0,4 g; Na₂MoO₄.2H₂O 0,01 g hòa tan trong 1 lít nước khử khoáng (Kafilzadeh and Mokhtari, 2013).

2.2.2 Đánh giá khả năng phân hủy phenol của 3 hệ VSV sau khi được làm giàu mật số trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol

Sau 5 thể hệ nuôi cấy liên tục nhằm gia tăng mật số VSV có khả năng phân hủy phenol ở mục 2.2.1, 1 mL dịch VSV ở thể hệ thứ 5 được chuyển vào bình tam giác chứa 49 mL môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L⁻¹ phenol. Mỗi hệ VSV được bố trí với 3 lần lặp lại tương ứng với 3 bình tam giác. Các bình tam giác chứa mẫu được lắc trên máy lắc với tốc độ 110 vòng.phút⁻¹ ở nhiệt độ phòng thí nghiệm và trong tối. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không được chủng VSV. Nồng độ phenol trong môi trường nuôi cấy được xác định vào các thời điểm 0, 1, 2, 3 và 5 ngày sau khi

nuôi cấy bằng phương pháp so màu với thuốc thử Folin – Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994).

2.3 Phân lập VSV có khả năng phân hủy phenol

Sau khi đánh giá khả năng phân hủy phenol của các hệ VSV trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng tiến hành chọn các hệ VSV có khả năng phân hủy phenol với hiệu suất cao để tiến hành phân lập và tách rỗng các dòng VSV có khả năng phân hủy phenol. Cách thực hiện như sau: Tiến hành pha loãng dịch nuôi cấy của hệ VSV ở thể hệ nuôi cấy thứ 5 theo hệ số 10, sau đó hút 50 μ L dung dịch ở từng nồng độ pha loãng trải lên trên bề mặt môi trường agar chứa phenol với nồng độ 500 mg.L^{-1} để phân lập và tách rỗng VSV. Đặt các đĩa petri chứa mẫu ở điều kiện phòng thí nghiệm và trong tối trong 5 ngày, tiến hành quan sát sự phát triển của khuẩn lạc VSV trên bề mặt đĩa môi trường. Chọn các khuẩn lạc VSV có kích thước, hình dạng, màu sắc, độ nổi, dạng bia khác nhau để tiến hành tách rỗng trên môi trường agar bổ sung phenol nồng độ 500 mg.L^{-1} liên tục trong 5 lần. Sau đó tiến hành mô tả hình thái khuẩn lạc, tế bào và nhuộm Gram của mỗi dòng VSV.

2.4 Đánh giá và so sánh khả năng phân hủy phenol của một số dòng vi sinh vật tuyển chọn

2.4.1 Nguồn vi sinh vật

Các dòng VSV sau khi phân lập tiến hành bố trí thí nghiệm để đánh giá và so sánh khả năng phân hủy phenol trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol. Đồng thời, hệ VSV có khả năng phân hủy phenol cao cũng được đưa vào thí nghiệm chung với các dòng VSV tuyển chọn nhằm so sánh hiệu quả phân hủy phenol giữa dòng đơn và cộng đồng. VSV được nuôi cấy trong bình tam giác 100 mL chứa 50 mL môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L^{-1} phenol trong hai ngày trên máy lắc với tốc độ 110 vòng.phút⁻¹ và trong tối. Sau hai ngày nuôi tiến hành pha loãng xác định mật số VSV. Mật số dòng vi sinh vật được xác định theo phương pháp nhỏ giọt (Hoben and Somasegaran, 1982). Hút 1 mL dung dịch nuôi cấy, tiến hành pha loãng dịch trích thành nhiều nồng độ pha loãng với hệ số pha loãng bằng 10. Hút 50 μ L dung dịch hòa loãng nhỏ thành 5 giọt trên bề mặt môi trường TSA. Mật số của hệ VSV được xác định theo phương pháp phương pháp của Ian và Charles (2004). Hút 1 mL dung dịch nuôi cấy, tiến hành pha loãng dịch trích thành nhiều nồng độ pha loãng với hệ số pha loãng bằng 10. Hút 50 μ L dung dịch hòa loãng cho lên trên bề mặt môi trường TSA. Dùng que chà thủy tinh tiết

trùng trải đều dịch trích lên trên bề mặt môi trường.

2.4.2 Bố trí thí nghiệm

Hút một lượng dung dịch VSV đã chuẩn bị ở mục 2.4.1 của từng dòng và hệ VSV vào bình tam giác có chứa sẵn 50 mL môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L^{-1} phenol đã được tiệt trùng nhiệt và để nguội để mật số VSV ban đầu đạt 10^2 CFU.mL⁻¹ ở thời điểm bố trí thí nghiệm. Mỗi dòng vi sinh vật và hệ VSV được bố trí với 3 lặp lại, tương ứng với 3 bình tam giác. Các bình tam giác chứa mẫu được lắc trên máy lắc với tốc độ 110 vòng.phút⁻¹ ở nhiệt độ phòng và trong tối. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không được chủng VSV. Mật số VSV và nồng độ phenol còn lại trong môi trường nuôi cấy lỏng được xác định vào các thời điểm 0, 1, 2, 3 và 5 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

2.5 Định danh dòng VSV có khả năng phân hủy phenol cao

Chọn ra dòng VSV thể hiện khả năng phân hủy phenol cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy ở mục 2.4 để tiến hành ly trích DNA. Sau đó khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi U1/U2 (Sandhu, 1995) với trình tự như sau: U1: 5' GTGAAATTGTTGAAAGGGAA 3', U2: 5' GACTCCTTGGTCCGTGTT 3'.

Thực hiện phản ứng PCR bằng máy PCR GeneAmp® PCR System 9700 để khuếch đại đoạn gen mục tiêu theo chu kỳ nhiệt sau: phản ứng PCR được biến tính ở 94°C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước (biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn cặp mồi vào khuôn ở nhiệt độ 55°C trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây), giai đoạn ổn định được duy trì ở 72°C trong 7 phút. Cuối cùng mẫu được trữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên agarose gel 1,5% bằng bộ điện di một chiều có bổ sung thêm ethidium bromide để kiểm tra sản phẩm. Sản phẩm PCR sau đó được gửi giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động tại công ty TNHH dịch vụ và thương mại Nam Khoa. Sau đó trình tự DNA được so sánh với gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu ncbi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), đồng thời kết hợp các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào để xác định mức độ loài của chúng.

2.6 Phân tích số liệu

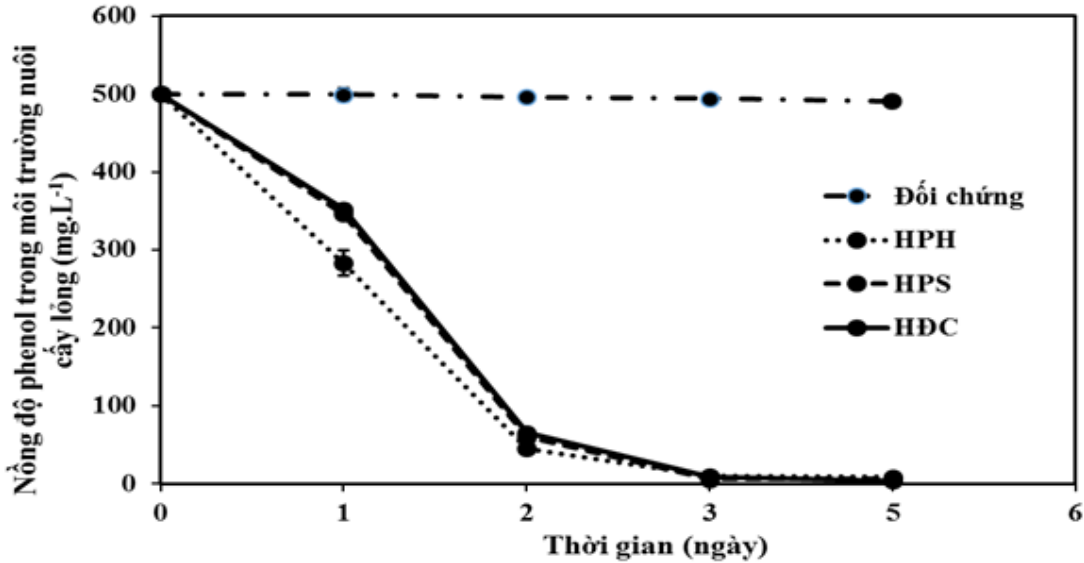
Số liệu thí nghiệm được tính toán và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và Minitab 16.2.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng phân hủy phenol của ba hệ VSV từ mẫu bùn và đất

Kết quả khảo sát khả năng phân hủy phenol trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500

mg.L⁻¹ phenol của ba hệ VSV sau 5 ngày nuôi cấy (Hình 1) cho thấy cả 3 hệ VSV thử nghiệm đều thể hiện khả năng phân hủy phenol tốt trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol.



Hình 1: Diễn biến nồng độ phenol còn lại trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng của các nghiệm thức thí nghiệm (n=3, độ lệch chuẩn)

Ghi chú: HPH: hệ VSV từ mẫu bùn khu tập trung nước thải Phòng thí nghiệm Hóa học đất, HPS: hệ VSV từ mẫu bùn khu tập trung nước thải Phòng thí nghiệm Sinh học đất và HDC: hệ VSV từ mẫu đất trồng cỏ

Trong suốt thời gian thí nghiệm, nghiệm thức đối chứng không chủng VSV có nồng độ phenol trong môi trường nuôi cấy ổn định và giảm rất ít không đáng kể so với nồng độ chủng ban đầu (500 mg.L⁻¹) và luôn cao hơn rất nhiều và khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với các nghiệm thức chủng VSV.

Sự khác biệt giữa ba hệ VSV về khả năng phân hủy phenol được thể hiện rõ nhất ở sau 1 ngày thí nghiệm. Ở ngày này, nghiệm thức được chủng với hệ VSV có nguồn gốc từ mẫu bùn Phòng thí nghiệm Hóa học đất có nồng độ phenol còn lại thấp nhất (283 mg.L⁻¹ so với nồng độ bổ trí ban đầu là 500 mg.L⁻¹), chiếm 36,3% hiệu suất phân hủy phenol và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và 2 nghiệm thức còn lại (p<0,05). Trong khi đó, nghiệm thức được chủng với hệ VSV có nguồn gốc từ mẫu bùn Phòng thí nghiệm Sinh học đất và từ mẫu đất trồng cỏ có nồng độ phenol còn lại trong môi trường nuôi cấy đạt lần lượt 346 và 352 mg.L⁻¹ và tương đương 17,3 và 15,9% hiệu suất phân hủy phenol. Mặc dù, hai nghiệm thức này có nồng độ phenol còn lại trong môi trường nuôi cấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với

nhau nhưng thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng (p<0,05) (500 mg.L⁻¹).

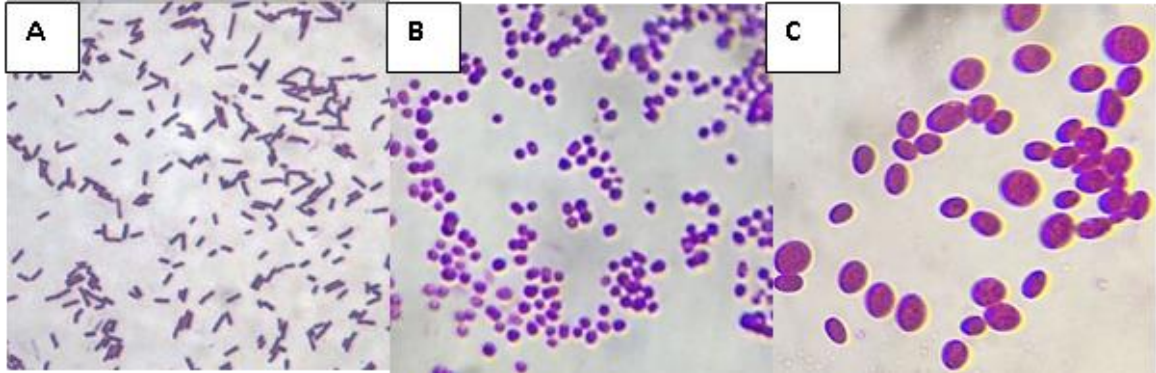
Ở các thời điểm thu mẫu còn lại (2, 3 và 5 ngày thí nghiệm) tất cả các nghiệm thức chủng các dòng VSV có nồng độ phenol còn lại rất thấp và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức này khi so sánh với nhau (p<0,05). Đặc biệt ở ngày 3 và 5 sau khi bố trí thí nghiệm, nồng độ phenol của 3 nghiệm thức chủng VSV hầu như được phân hủy hoàn toàn. Điều này cho thấy cả 3 hệ VSV từ bùn và đất sau 5 thế hệ nhân mật số các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy phenol thể hiện khả năng phân hủy rất hiệu quả phenol với tỉ lệ phân hủy dao động từ 87,6-91,5% sau 5 ngày nuôi cấy. Vì vậy, cả 3 hệ VSV này được sử dụng để phân lập VSV có khả năng phân hủy phenol.

3.2 Phân lập vi sinh vật có khả năng phân hủy phenol từ mẫu bùn khu xả nước thải phòng thí nghiệm

Từ ba hệ VSV có khả năng phân hủy phenol đã phân lập được 28 dòng VSV trong đó, 11 dòng VSV có nguồn gốc từ mẫu bùn Phòng thí nghiệm Hóa học

đất (chiếm tỉ lệ 39,2%), 8 dòng VSV có nguồn gốc từ mẫu bùn Phòng thí nghiệm Sinh học đất (chiếm tỉ lệ 28,6%) và 9 dòng VSV có nguồn gốc từ mẫu đất trồng cỏ (chiếm tỉ lệ 32,2%). Hình thái khuẩn lạc của 28 dòng VSV phân lập có các dạng như sau: tròn (53,6%), mép không đều (46,4%). Màu sắc khuẩn lạc đa dạng với các màu: trắng đục, mờ đục và vàng. Độ nổi của khuẩn lạc gồm phẳng và lồi, kích thước

vi khuẩn lạc dao động từ 2 - 6 mm. Ngoài ra, dựa vào kết quả khảo sát đặc điểm hình thái tế bào (tế bào vi khuẩn có dạng hình que và cầu với kích thước nhỏ, nấm men có dạng hình trụ hoặc hình bầu dục và có kích thước lớn) của 28 dòng VSV phân lập đã nhận diện được 17 dòng là vi khuẩn và 11 dòng là nấm men (Hình 2).



Hình 2: Hình thái tế bào VSV được quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1000x (A) Tế bào vi khuẩn hình que; (B) Tế bào vi khuẩn hình cầu; (C) Tế bào nấm men hình bầu dục

3.3 Đánh giá khả năng phân hủy phenol của các dòng VSV tuyển chọn

3.3.1 Khả năng phân hủy phenol của các dòng VSV tuyển chọn

Sau 2 đợt bố trí thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy phenol của 28 dòng VSV phân lập, kết quả cho thấy ở đợt bố trí thí nghiệm 1 (12 dòng VSV) vào thời điểm 2 ngày sau khi bố trí thí nghiệm 6 nghiệm thức chủng 6 dòng VSV có ký hiệu PS1.1, PS2, PS4.2, PS5, PS6 và ĐC5 có nồng độ phenol còn lại trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol thấp hơn so với 6 nghiệm thức chủng 6 dòng VSV còn lại và cả nghiệm thức đối chứng. Khi đó, nồng độ phenol của các nghiệm thức này lần lượt còn lại 11,8; 13,6, 10,5; 10,3; 10,1 và 9,33 mg.L⁻¹ so với nồng độ bố trí ban đầu (500 mg.L⁻¹) tương đương với hiệu suất phân hủy phenol dao động trong khoảng từ 97,6 đến 98,2 %, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức đối chứng và các dòng VSV còn lại. Trong khi đó, 6 nghiệm thức chủng 6 dòng VSV còn lại ký hiệu PH11, PH10, PH11, ĐC1.1, ĐC1.2 và ĐC4 có khả năng phân hủy phenol thấp hơn. Nồng độ phenol còn lại trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol của các nghiệm thức chủng các dòng VSV này lần lượt đạt 420, 381, 163, 59,2, 56,7 và 419 mg.L⁻¹ tương ứng với hiệu suất phân hủy phenol của các dòng VSV này dao động trong khoảng từ 13,3 % đến 86,2 %. Ở đợt bố thí nghiệm 2 (16 dòng VSV) vào thời điểm 2 và 3 ngày sau khi bố trí thí nghiệm, nghiệm thức

chủng dòng VSV có ký hiệu PS4.1 có nồng độ phenol còn lại trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol thấp hơn so với 15 nghiệm thức chủng 15 dòng VSV còn lại và cả nghiệm thức đối chứng, khi đó, nồng độ phenol còn lại của nghiệm thức này lần lượt đạt 35 và 4,51 mg.L⁻¹ so với nồng độ bố trí ban đầu (500 mg.L⁻¹) tương đương với hiệu suất phân hủy phenol 92,9 và 99 %, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức đối chứng và các dòng VSV còn lại sau 2 và 3 ngày thí nghiệm. Trong khi đó, 15 nghiệm thức còn lại chủng 15 dòng VSV còn lại có ký hiệu PH2, PH3, PH4, PH5, PH6, PH7, PH8, PH9, PS1.2, PS3, ĐC2, ĐC3, ĐC6, ĐC7 và ĐC8 có khả năng phân hủy phenol thấp hơn. Nồng độ phenol còn lại trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol của các nghiệm thức chủng các dòng VSV này lần lượt còn lại dao động trong khoảng từ 159 đến 289 mg.L⁻¹ tương ứng với hiệu suất phân hủy phenol của các dòng VSV này dao động trong khoảng từ 36,6 % đến 66,9 % sau 3 ngày nuôi cấy. Vì vậy sau hai đợt bố trí thí nghiệm 7 dòng VSV có ký hiệu: PS1.1, PS2, PS4.1, PS4.2, PS5, PS6 và ĐC5 thể hiện khả năng phân hủy phenol cao nhất được tuyển chọn để bố trí thí nghiệm chung với nhau trong cùng một điều kiện thí nghiệm giúp dễ dàng so sánh khả năng phân hủy phenol của 7 dòng VSV này. Sáu dòng VSV ký hiệu PS1.1, PS2, PS4.1, PS4.2, PS5 và PS6 có nguồn gốc từ hệ VSV mẫu bùn nơi tập trung nước thải phòng thí nghiệm Sinh học đất và dòng VSV ký hiệu ĐC5 có nguồn gốc từ

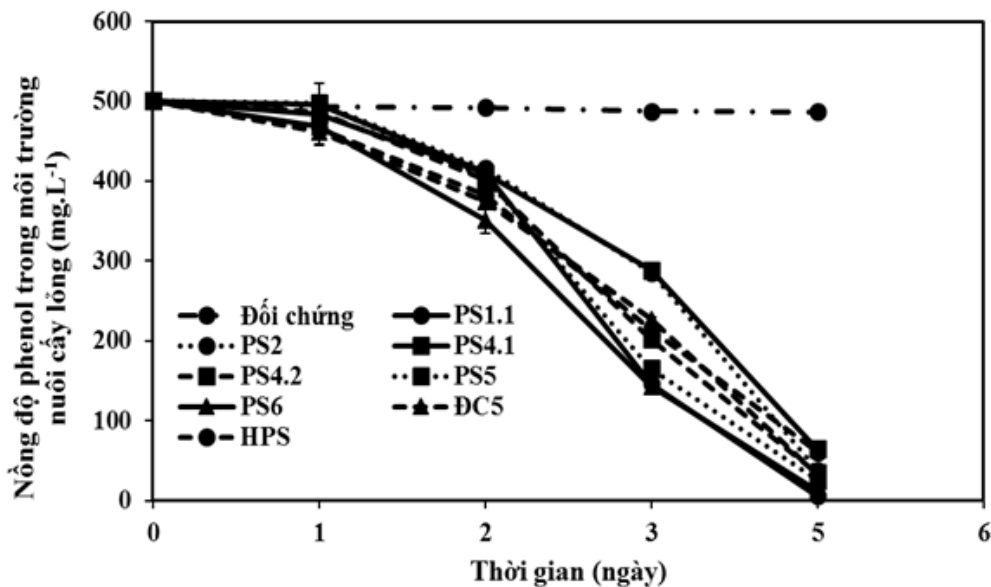
hệ VSV mẫu đất trồng cỏ. Điều này cho thấy tại khu vực phơi nhiễm với phenol cao như khu xả nước thải phòng thí nghiệm có nhiều dòng VSV có khả năng phân hủy phenol cao. Ngoài ra, trong môi trường đất cỏ vẫn có sự hiện diện của VSV có khả năng phân hủy phenol tốt.

Kết quả khảo sát khả năng phân hủy phenol của 7 dòng VSV được tuyển chọn và hệ VSV có nguồn gốc từ mẫu bùn ao chứa nước thải phòng thí nghiệm sinh học đất trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol sau 5 ngày bố trí thí nghiệm được trình bày ở Hình 3. Kết quả cho thấy giữa các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa thống kê về khả năng phân hủy phenol theo thời gian thí nghiệm và nồng độ phenol còn lại trong môi trường nuôi cấy lỏng giảm rất nhanh trong thời gian thí nghiệm, ngoại trừ nghiệm thức đối chứng không chủng VSV.

Vào thời điểm 1 ngày thí nghiệm, các nghiệm thức chủng VSV và nghiệm thức đối chứng có nồng

độ phenol trong môi trường nuôi cấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhau ($p < 0,05$). Nồng độ phenol ở các nghiệm thức dao động từ 461 đến 498 mg.L^{-1} .

Ở thời điểm 2 ngày thí nghiệm, nồng độ phenol còn lại trong môi trường nuôi cấy của nghiệm thức chủng dòng VSV PS6 là 351 mg.L^{-1} (chiếm tỉ lệ 32,2 % hiệu suất phân hủy phenol), thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức chủng VSV còn lại và nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Trong đó, nồng độ phenol của các nghiệm thức được chủng với VSV còn lại dao động từ 374 đến 476 mg.L^{-1} . Ngoài ra, nghiệm thức chủng hệ VSV từ mẫu bùn thải phòng thí nghiệm sinh học đất (HPS) có khả năng phân hủy phenol thấp hơn so với nghiệm thức chủng dòng VSV PS6 với nồng độ phenol còn lại là 383 mg.L^{-1} và đạt 27,1 % hiệu suất phân hủy phenol ($p < 0,05$).



Hình 3: Diễn biến về nồng độ phenol còn lại trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng của các nghiệm thức thí nghiệm (n =3, độ lệch chuẩn)

Ghi chú: PS1.1, PS2, PS4.1, PS4.2, PS5, PS6: Các dòng VSV phân lập từ mẫu bùn Phòng thí nghiệm Sinh học đất; DC5: Các dòng VSV phân lập từ mẫu đất trồng cỏ; HPS: hệ VSV từ mẫu bùn Phòng thí nghiệm Sinh học đất

Vào thời điểm 3 ngày thí nghiệm, nghiệm thức chủng dòng PS1.1 và PS6 có nồng độ phenol còn lại trong môi trường nuôi cấy lần lượt đạt 146 và 143 mg.L^{-1} (tương đương với 71,4 và 72,9% hiệu suất phân hủy phenol), thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nghiệm thức các nghiệm thức chủng các dòng VSV còn lại và nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Ngoài ra, nghiệm thức chủng hệ VSV từ mẫu bùn phòng thí nghiệm sinh học đất

(HPS) có nồng độ phenol còn lại trong môi trường nuôi cấy là 213 mg.L^{-1} (tương ứng với 58,9% hiệu suất phân hủy phenol).

Ở thời điểm 5 ngày thí nghiệm, các nghiệm thức có chủng các dòng VSV đơn lẻ và hệ VSV đều có nồng độ phenol còn lại trong môi trường lỏng rất thấp. Đặc biệt, nghiệm thức được chủng với dòng PS1.1 và PS6 có nồng độ phenol trong môi trường

lồng lần lượt 5,9 và 12,3 mg.L⁻¹ (tương đương với 98,9 và 97,6% hiệu suất phân hủy phenol), thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (p<0,05). Tóm lại, hai dòng vi sinh vật ký hiệu PS1.1 và PS6 có tiềm năng ứng dụng cao trong việc phân hủy phenol.

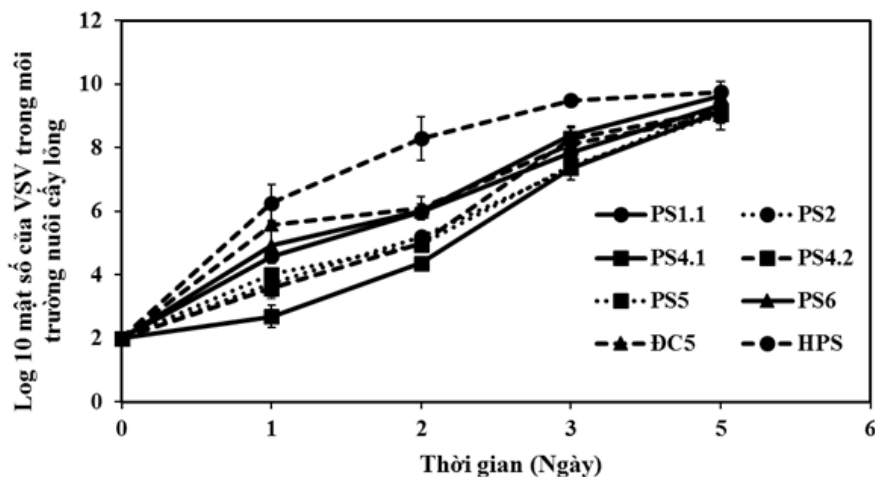
Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy có nhiều nhóm VSV có khả năng phân hủy phenol cao. Trong đó, nghiên cứu của Kafilzadeh and Mokhtari (2013) cho thấy 2 dòng vi khuẩn phân lập được định danh là *Pseudomonas putida* và *Acinetobacter* sp. thể hiện khả năng phân hủy phenol trong môi trường khoáng tối thiểu với hiệu suất phân hủy phenol đạt 100 % sau 7 ngày thí nghiệm với nồng độ bổ trí ban đầu (400 mg.L⁻¹). Bên cạnh đó, dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. BTLP1 được nghiên cứu bởi Cung Thị Ngọc Mai và ctv. (2012) cho thấy dòng vi khuẩn phân lập này có khả năng loại bỏ phenol với hiệu suất lên đến 92,5 % trong 7 ngày. Ngoài ra, dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. VTPG5 (LC057207) khi phát triển trong điều kiện tối ưu dòng vi khuẩn này tạo ra biofilm giúp gia tăng hiệu suất phân hủy lên đến 99,8 % sau 7 ngày nuôi cấy với hàm lượng ban đầu 200 mg.L⁻¹ (Lê Thị Nhi Công và ctv., 2016). Nghiên cứu của Abarian et al. (2015) cho thấy 2 dòng vi khuẩn định danh *Pseudomonas putidas* strain AHB62P và *Arthrobacter scleromae* strain AHB69P có khả năng làm giảm nồng độ phenol từ 500 – 600 mg.L⁻¹ trong 7 ngày nuôi cấy.

Ngoài vi khuẩn, nấm men cũng có khả năng phân hủy phenol rất cao. Theo nghiên cứu của Filipowicz et al. (2017) cho thấy 3 loài nấm men

Candida subhashii, *Candida oregonensis* và *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* có khả năng phân hủy phenol rất cao trong thời gian ngắn, cụ thể *Candida subhashii* và *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* có khả năng làm giảm nồng độ phenol đến 1000 mg.L⁻¹ trong 2 ngày nuôi cấy. Riêng loài *Candida oregonensis* có khả năng làm giảm nồng độ phenol từ 500 - 750 mg.L⁻¹ trong 2 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó nghiên cứu của Yu et al. (2005) cũng cho thấy nấm men thuộc chi *Candida* sp. có khả năng làm giảm nồng độ phenol đến 500 mg.L⁻¹ trong 2 ngày nuôi cấy. Một nghiên cứu khác của Hu et al. (2006) cho thấy dòng nấm men *Candida tropicalis* – P4 có khả năng phân hủy 1000 ppm phenol trong 3 ngày và dòng nấm men *Candida tropicalis* – P2 có khả năng phân hủy 1000 ppm phenol trong 4 ngày.

3.3.2 Mật số VSV trong môi trường nuôi cấy lỏng

Mật số VSV của các nghiệm thức theo thời gian thí nghiệm được trình bày trong Hình 4 cho thấy có sự gia tăng về mật số VSV của các nghiệm thức chủng VSV trong môi trường nuôi cấy trong suốt 5 ngày thí nghiệm. Mật số VSV của các nghiệm thức chủng VSV tăng rất nhanh ở giai đoạn 1-3 ngày thí nghiệm, sau đó, tăng chậm lại và có xu hướng ổn định ở giai đoạn 3-5 ngày sau thí nghiệm. Kết quả khảo sát mật số VSV ở nghiệm thức đối chứng cho thấy không có bất cứ VSV nào hiện diện, điều này cho thấy các nghiệm thức không bị nhiễm vi sinh vật từ bên ngoài.



Hình 4: Diễn biến mật số VSV trong môi trường nuôi cấy lỏng bổ sung phenol của các nghiệm thức thí nghiệm (n = 3, độ lệch chuẩn)

Ghi chú: PS1.1, PS2, PS4.1, PS4.2, PS5, PS6: là các dòng VSV phân lập từ mẫu bùn Phòng thí nghiệm Sinh học đất; DC5: là dòng VSV phân lập từ mẫu đất trồng cỏ; HPS: hệ VSV từ mẫu bùn Phòng thí nghiệm Sinh học đất

Vào thời điểm 1 ngày sau khi bố trí thí nghiệm, mật số VSV tăng rất nhanh so với thời điểm 0 ngày bố trí thí nghiệm, nghiệm thức chủng hệ VSV từ mẫu bùn phòng thí nghiệm sinh học đất và dòng VSV ký hiệu ĐC5 có mật số VSV lần lượt là 10^6 và 10^5 CFU.mL⁻¹, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$), điều này có thể là do vào thời điểm này vi sinh vật bắt đầu thích nghi và tiến hành nhân mật số rất nhanh trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 500 mg.L⁻¹ phenol. Các nghiệm thức còn lại có mật số VSV dao động từ 10^2 - 10^4 CFU.mL⁻¹. Nghiệm thức chủng dòng VSV ký hiệu PS4.1 có mật số thấp nhất (10^2 CFU.mL⁻¹).

Vào thời điểm 2 ngày sau khi thí nghiệm, mật số VSV của các nghiệm thức chủng VSV bắt đầu tăng nhanh, trong đó, nghiệm thức có chủng hệ VSV từ mẫu bùn phòng thí nghiệm sinh học đất (HPS) có mật số VSV đạt 10^8 CFU.mL⁻¹ ($p < 0,05$). Kể đến, các nghiệm thức chủng các dòng VSV ký hiệu PS1.1, ĐC5 và PS6 có mật số VSV đều đạt 10^6 CFU.mL⁻¹, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có chủng các dòng vi sinh vật còn lại ($p < 0,05$).

Vào thời điểm 3 ngày sau khi thí nghiệm, mật số VSV của các nghiệm thức chủng VSV tiếp tục tăng lên cao, trong đó, nghiệm thức chủng dòng VSV ký hiệu PS1.1, PS4.1, PS6 và ĐC5 có mật số VSV cao hơn so với 3 nghiệm thức chủng 3 dòng VSV còn lại. Mật số VSV của 4 dòng này đều đạt 10^8 CFU.mL⁻¹, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 3

nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Bên cạnh đó, mật số VSV ở nghiệm thức chủng hệ VSV từ mẫu bùn phòng thí nghiệm sinh học đất (HPS) đạt cao nhất (đạt 10^9 CFU.mL⁻¹). Vào thời điểm 5 ngày sau khi thí nghiệm mật số của các nghiệm thức có chủng các dòng VSV và hệ VSV đạt trạng thái ổn định và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức.

Mật số VSV của nghiệm thức có chủng hệ VSV từ mẫu bùn phòng thí nghiệm sinh học (HPS) tăng nhanh, và cao hơn so với các nghiệm thức chủng các dòng VSV đơn giai đoạn từ 0 đến 3 ngày sau khi bố trí. Tuy nhiên, khả năng phân hủy phenol của hệ VSV từ mẫu bùn phòng thí nghiệm sinh học (HPS) thấp hơn so với dòng VSV đơn. Điều này cho thấy trong hệ VSV có một số dòng cơ hội, chỉ hưởng lợi từ hoạt động phân hủy phenol của nhóm VSV phân hủy phenol mà không thể phân hủy phenol.

3.4 Định danh hai dòng VSV tuyển chọn

Kết quả giải trình tự đoạn gen 28S-rRNA hai dòng nấm men PS1.1 và PS6 được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen 28S-rRNA của dòng hai dòng nấm men PS1.1 và PS6 khi được so sánh với cơ sở dữ liệu ncbi có độ tương đồng 100% với loài nấm men *Candida tropicalis*. Mặt khác, kết hợp với các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, tế bào, hai dòng nấm men PS1.1 và PS6 lần lượt được định danh như là *Candida tropicalis* PS1.1 và *Candida tropicalis* PS6.

Bảng 1: Định danh hai dòng VSV theo độ tương đồng đoạn gen 28S rRNA

| Ký hiệu | Nguồn gốc | Độ tương đồng (%) | Các dòng nấm men trên cơ sở dữ liệu | | Định danh |
|---------|---------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|------------|---------------------------------|
| | | | Nấm men | Số đăng kí | |
| PS1.1 | Mẫu bùn Phòng thí nghiệm Sinh học đất | 100 | <i>Candida tropicalis</i> | LC317532.1 | <i>Candida tropicalis</i> PS1.1 |
| PS6 | Mẫu bùn Phòng thí nghiệm Sinh học đất | 100 | <i>Candida tropicalis</i> | LC317532.1 | <i>Candida tropicalis</i> PS6 |

4 KẾT LUẬN

Cả ba hệ VSV có nguồn gốc từ đất bùn từ ao chứa nước xả thải Phòng thí nghiệm Sinh học đất, Phòng thí nghiệm Hóa học đất và đất trồng cỏ thuộc Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ có chứa nguồn vi sinh vật có khả năng phân hủy phenol cao sau 5 thế hệ nhân nuôi sinh khối liên tục trong phòng thí nghiệm trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung phenol với nồng độ 500 mg.L⁻¹ với hiệu suất phân hủy phenol dao động từ 87,6 % đến 91,5 % sau 5 ngày nuôi cấy. Hai mươi tám dòng

VSV được phân lập từ 3 cộng đồng VSV này có sự đa dạng cao về hình thái khuẩn lạc, tế bào và khả năng phân hủy phenol với hiệu suất phân hủy phenol dao động từ 16,9 % đến 99,8 % ở thời điểm 5 ngày sau khi nuôi cấy. Ngoài ra, các dòng VSV đơn có khả năng phân hủy phenol cao hơn so với hệ VSV từ bùn chứa nước thải phòng thí nghiệm sinh học đất (HPS). Hai dòng nấm men ký hiệu PS1.1 và PS6 có khả năng phân hủy phenol cao nhất với hiệu suất phân hủy phenol lần lượt đạt 98,9 % và 97,6 % sau 5 ngày nuôi cấy và được định danh như là *Candida tropicalis* PS1.1 và *Candida tropicalis* PS6. Do đó,

hai dòng nấm men này có tiềm năng ứng dụng cao trong việc xử lý ô nhiễm phenol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Moslem, A., Mehdi, H., and Arastoo, B.D., 2015. Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from Midok copper mine at Shahrabak provenance in Iran. *Iranian Journal of Environmental Technology*. 1(2): 21-34.
- Cung Thị Ngọc Mai, Thái Thị Thùy Dương, Nguyễn Văn Bắc, Nguyễn Thị Thu Hiền và Nghiên Ngọc Minh, 2012. Phân loại chủng vi khuẩn BTLD1 có khả năng phân hủy phenol bằng phương pháp phân tích trình tự nucleotit của đoạn gen 16s rARN. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam – Đại học Thái Nguyên*. 50(1): 13-19.
- Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., and Cieśliński, H., 2017. Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, & Soil Pollution*. 228(6): 210.
- Hoben, H., and Somasegaran, P., 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 1246-1247.
- Hu, Z., Wu, Y.R., Lin, B.K., Maskaoui, K., Zhuang, D.H., and Zheng, T.L., 2006. Isolation and characterization of two phenol-degrading yeast strains from marine sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 76(6): 899-906
- Ian, L.P., Charles, P.G., 2004. *Environmental microbiology*. Elsevier Academic Press.
- Jiang, Y., Yang, K., Deng, T., Ji, B., Shang, Y. and Wang, H., 2018. Immobilization of halophilic yeast for effective removal of phenol in hypersaline conditions. *Water Science and Technology* 77(3-4): 706-713.
- Kafilzadeh, F. and Mokhtari, S., 2013. Isolation and identification of phenol degrading bacteria from mangrove sediments in the persian gulf (asalyeh) and their growth kinetics assay. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 6(2): 189-196.
- Krallish, I., Gonta, S., Savenkova, L., Bergauer, P. and Margesin, R., 2006. Phenol degradation by immobilized cold-adapted yeast strains of *Cryptococcus terreus* and *Rhodotorula creatinivora*. *Extremophiles*. 10: 441-449.
- Lê Thị Nhi Công, Cung Thị Ngọc Mai và Nghiên Ngọc Minh, 2013. Một số yếu tố sinh lý sinh hóa ảnh hưởng tới khả năng tạo màng sinh học chủng nấm men *Trichosporon asahii* QN – B1 phân hủy phenol phân lập từ Hạ Long, Quảng Ninh. *Tạp chí khoa học Viện Công nghệ sinh học, Viện 1982 Hàn lâm KH & CN Việt Nam*. 35(3se): 106-113.
- Lika, K. and Papadakis, I.A., 2009. Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *Journal of Sea Research*. 62: 135-146.
- Pradeep, N.V, Anupama, S., Navya, K., Shalini, H.N., Idris, M., and Hampannavar, U.S., 2015. Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review. *Applied Water Science*. 5: 105-112.
- Sandhu, G.S., Kline, B.C., Stockman, L., and Roberts, G.D., 1996. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(11): 2913-2919
- Wang, Y., Song, J., Zhao, W., He, X., Chen, J. and Xiao, M., 2011. In situ degradation of phenol and promotion of plant growth in contaminated environments by a single *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Journal of Hazardous Materials*. 192: 354-360.
- Waterman, P.G. and Mole, S., 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain.
- Yu, Z. and Wen, X., 2005. Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 56(2): 109-114.