Khảo sát sự phân hủy toluene và chlorotoluene bởi vi khuẩn *Comamonas testosterone* KT5 cố định trong alginate

Hà Danh Đức*

Trường Đại học Đồng Tháp

Ngày nhận bài 31/12/2019; ngày chuyển phản biện 6/1/2020; ngày nhận phản biện 10/2/2020; ngày chấp nhận đăng 17/2/2020

Tóm tắt:

Toluene cũng như chlorotoluene là những hợp chất được sử dụng phổ biến và thường được phát hiện trong môi trường bị ô nhiễm, nhất là môi trường nước. Vi khuẩn *Comamonas testosterone* KT5 có khả năng phân hủy hiệu quả các chất này. Khảo sát khả năng làm sạch toluene cũng như chlorotoluene trong môi trường đất và nước của vi khuẩn *Comamonas testosterone* KT5 dạng tự do và cố định cho thấy, KT5 được cố định trong alginate phân hủy các chất này với tốc độ cao hơn so với dạng tự do. Vi khuẩn cố định còn chịu đựng tốt hơn so với dạng tự do ở độ pH quá thấp hay quá cao. Ngoài ra, vi khuẩn cố định trong alginate còn có thể phân hủy tốt hơn dạng tự do khi môi trường bị nhiễm kim loại nặng. Mức độ ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phân hủy toluene là $As^{5+} \approx Cd^{2+} \approx Hg^{2+} \approx Cu^{2+} > Pb^{2+} \approx Ni^{2+}$.

Từ khóa: **alginate, chlorotoluene, *Comamonas testosterone,* kim loại nặng, toluene.**

Chỉ số phân loại: **1.5**

Đặt vấn đề

Toluene cũng như chlorotoluenes được sản xuất một lượng lớn trên toàn thế giới vì chúng được sử dụng phổ biến để sản xuất nhiều loại hóa chất như chất chống cháy, thuốc nhuộm, thuốc trừ sâu…, dùng trong y tế, sản xuất vải, polymer và nhiều sản phẩm khác [1]. Ngoài ra, chúng còn được sử dụng trong chất tẩy rửa và dung môi. Hàng năm, một lượng lớn các hợp chất này được thải ra môi trường, gây ô nhiễm nguồn nước. Toluene và chlorotoluene được phát hiện trong môi trường, bao gồm đất, nước mặt và nước ngầm [2-7], ngoài ra chúng còn được phát hiện trong không khí [8] và thực phẩm [9].

Toluene và chlorotoluenes là những chất khá độc nên việc tẩy sạch chúng là cần thiết. Một trong những cách tẩy sạch chúng là dùng các phương pháp sinh học. Phương pháp này an toàn, rẻ tiền, thân thiện với môi trường và hiệu quả cao so với các phương pháp khác. Trên thế giới đã có những nghiên cứu về các vi sinh vật có thể phân hủy được hợp chất toluene [1, 10-20] nhưng chỉ có một công bố được thực hiện ở Việt Nam [21].

Mặc dù vậy, đa số các khảo sát trước đây đều thực hiện trong môi trường lỏng và sử dụng vi sinh vật dạng lơ lửng mà ít đề cập đến phân hủy trong đất và sử dụng dạng cố định. Một trong những giải pháp cố định vi khuẩn là sử dụng alginate. Alginate có nguồn gốc tự nhiên, dễ phân hủy trong môi trường, rẻ tiền, dễ sử dụng, không độc nên thường được dùng trong y tế, thực phẩm cũng như dùng để cố định vi sinh vật. *C. testosterone* KT5 được phân lập từ đất và bùn, và đã được khảo sát về khả năng phân hủy nhiều loại chlorotoluene [21]. Bài báo nghiên cứu sự phân hủy của các hợp chất này bởi vi khuẩn *C. testosterone* KT5 được cố định trong alginate.

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Vi khuẩn *C. testosterone* KT5 được nuôi cấy trong dung dịch khoáng chất có các thành phần (g/l) như sau: Na_2HPO_4 2,79; KH_2PO_4 1,00; $(NH_4)_2SO_4$ 1,00; $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0,20 và 1,00 ml các nguyên tố vi lượng. Các nguyên tố vi lượng bao gồm H_3BO_3 0,30; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,20; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,10; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,03; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,03; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,02; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01. Độ pH của môi trường được điều chỉnh bằng dung dịch HCl và NaOH. Môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút trước khi sử dụng. Tất cả hóa chất đều được mua từ Sigma-Aldrich hoặc Merck với độ tinh khiết >98%.

Phương pháp cố định vi khuẩn trong alginate

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường khoáng như trên ở 150 v/ph và ở nhiệt độ phòng (trung bình là 30°C). Toluene (2 mM) và yeast extract (1,0 g/l) được bổ sung

*Email: hadanhduc@gmail.com

Determination of degradation of toluene and chlorotoluenes by *Comamonas testosterone* KT5 immobilized in alginate

Danh Duc Ha*

Dong Thap University

Received 31 December 2019; accepted 17 February 2020

Abstract:

Toluene and chlorotoluenes are widely used ingredients in industries and commonly detected in polluted environments, especially in wastewater. *Comamonas testosterone* KT5 that effectively degraded these compounds was determined to disintegrate the toxic chemicals in liquid culture and soil. The results presented that the bacteria immobilized in alginate degraded toluene and chlorotoluenes more effectively than those of free cells. Besides, the immobilized cells showed higher toleration in extremely low and high pH levels. Moreover, the immobilized form reduced the effects of heavy metals during the degradation process. The effects of heavy metals on toluene degradation were in order of $As^{5+} \approx Cd^{2+} \approx Hg^{2+} \approx Cu^{2+} > Pb^{2+} \approx Ni^{2+}$.

Keywords: **alginate, chlorotoluenes, *Comamonas testosterone*, heavy metals, toluene.**

Classification number: **1.5**

nhằm kích thích vi khuẩn sinh sôi. Số lượng vi khuẩn trong môi trường lúc này trung bình là $3,5\times10^8$ CFU/ml (đếm bằng số khuẩn lạc xuất hiện trên thạch agar). Sau 24 giờ, môi trường lỏng được ly tâm ở 8.000 v/ph trong 10 phút. Vi khuẩn thu được được chuyển vào môi trường khoáng, khuấy đều rồi được ly tâm lần 2 nhằm làm sạch hoá chất có thể còn sót lại bám vào vi khuẩn. Vi khuẩn sau đó được cho vào môi trường khoáng mới, trộn đều với dung dịch chứa alginate đã khử trùng để thu được dung dịch cuối cùng có $3,5\times10^9$ CFU/ml và 3% alginate. Dựa vào số lượng vi khuẩn ban đầu và số lượng hạt alginate tạo ra số lượng vi khuẩn trung bình trong mỗi hạt được xác định.

Quá trình cố định vi khuẩn được thực hiện bằng cách: dung dịch chứa vi khuẩn và alginate được nhỏ giọt vào dung dịch chứa 3% $CaCl_2$ bằng syringe. Dung dịch 3% $CaCl_2$ này được khuấy đều bằng khuấy từ ở tốc độ 500 v/ph trong suốt quá trình nhỏ giọt. Hạt được tạo ra, rửa lại rồi chuyển sang dịch chứa 3% $CaCl_2$ và bảo quản trong 24 giờ ở nhiệt độ 4°C để hoàn tất quá trình cố định.

Thí nghiệm phân hủy toluene và chlorotoluene trong môi trường lỏng

Quá trình phân hủy hóa chất của vi khuẩn được thực hiện ở 150 v/ph và nhiệt độ phòng với nồng độ hóa chất là 2 mM trong 12 giờ. Đối với thí nghiệm ảnh hưởng của kim loại đến sự phân hủy, kim loại nặng bao gồm As^{5+} (As_2O_5), Cd^{2+} ($CdCl_2$), Cu^{2+} ($CuCl_2{\cdot}2H_2O$), Hg^{2+} ($HgCl_2$) và Ni^{2+} ($NiCl_2$) được thêm vào môi trường khoáng với nồng độ các ion là 2 mM. Lượng vi khuẩn trong dung dịch là $3,5\times10^9$ CFU/ml áp dụng cho cả thí nghiệm phân hủy bởi vi khuẩn tự do và vi khuẩn cố định.

Xác định sự sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường lỏng và trong alginate

Số lượng vi khuẩn trong môi trường lỏng sau một thời gian ủ được xác định dựa vào số lượng khuẩn lạc hình thành trên đĩa agar. Phương pháp xác định số lượng vi khuẩn trong hạt alginate được thực hiện theo mô tả của Schoebitz và ctv (2012) [22]. Môi trường sau khi ủ được bổ sung $NaNO_3$ đến nồng độ 6% và lắc đều cho đến khi hạt alginate tan hết (khoảng 10 phút). Dung dịch được pha loãng rồi trải đều trên đĩa agar chứa môi trường khoáng chất đã mô tả ở trên và đếm số khuẩn lạc hình thành sau 24 giờ ủ ở nhiệt độ 30°C.

Thí nghiệm phân hủy toluene và chlorotoluene trong đất

Đất được thu từ vườn cây trong Trường Đại học Đồng Tháp ở độ sâu 10-50 cm, nơi chưa từng bị nhiễm toluene hay chlorotoluene. Mẫu đất sau đó được bóp nhỏ bằng tay, trộn đều rồi rây sàng qua tấm lưới thép cho phép những hạt có kích thước nhỏ hơn 2 mm đi qua. Mẫu đất được xác định thành phần trước khi tiến hành thí nghiệm (bảng 1).

Bảng 1. Thành phần của đất (tính theo trọng lượng đất khô).

Thành phần	Hàm lượng
Cát	43,6±5,6%
Phù sa	34,7±7,7%
Đất sét	19,0±6,6%
Chất hữu cơ	21,4±3,5 g/kg
Nitơ	1,27±0,4 g/kg
Phốtpho	1,13±0,2 g/kg
pH	6,6±0,7
Khối lượng riêng	1,56±0,3 g/cm^3
Toluene và chlorotoluene	0

Đối với thí nghiệm phân hủy hóa chất bằng vi khuẩn tự do, vi khuẩn được làm giàu trong môi trường khoáng rồi xịt vào đất và trộn đều. Tương tự, đối với vi khuẩn cố định trong alginate, hạt alginate cũng được trộn lẫn với đất. Lượng vi khuẩn được bổ sung vào đất ở nghiệm thức vi khuẩn cố định và vi khuẩn tự do đều là 10^7 CFU/g đất khô. Đất được bảo quản trong bình nhựa, đậy kín bằng nắp. Đất được thêm nước để có độ ẩm 25%. Hàng ngày nắp được mở ra chừng 2 phút để O_2 có thể khuếch tán vào và CO_2 khuyết tán ra ngoài. Đất cũng được lắc đều 1 lần khoảng 5 phút để trộn lại và để ôxy khuyếch tán xuống lớp đất sâu. Do đậy nắp thường xuyên nên độ ẩm trong đất thay đổi không đáng kể trong suốt quá trình ủ. Các nghiệm thức đối chứng, alginate không chứa vi khuẩn được trộn vào đất.

Mẫu đất được lấy để phân tích hóa chất còn lại sau một thời gian ủ. Toluene và cholorotoluene trong đất được trích ly bằng methylene chloride (CH_2Cl_2). 5 g đất được cho vào dung dịch chứa 15 ml methylene chloride, thêm nước để được 25 ml rồi trộn đều, vortex trong 5 phút. Mẫu được để yên trong vòng 10 phút. Phần methylene chloride phía trên tách khỏi dung dịch được chuyển sang ống tube mới. Quá trình này được thực hiện 2 lần. Dung dịch methylene chloride được làm sạch bằng 0,22 µm syringe filter. Hiệu quả thu hồi trung bình của toluene, 2-chlorotoluene (2CT), 3-chlorotoluene (3CT) và 4-chlorotoluene (4CT) từ đất tương ứng là 92,4, 93,0, 95,5 và 96,6%.

Scanning cấu trúc bên trong của alginate

Quá trình chụp hình cấu trúc bên trong của hạt alginate được thực hiện tại Đại học Chulalongkorn, Thái Lan. Quá trình scanning được thực hiện nhờ máy Scanning Electron Microscope Analysis (SEM). Hạt alginate được cố định bằng 1% osmium tetroxide (O_sO_4) 1% trong 24 giờ rồi được rửa lại bằng nước nguyên chất. Mẫu được dehydrate hóa bằng ethanol lần lượt là 30, 50, 70, 90% và cồn tuyệt đối. Mẫu sau đó được làm khô bằng CO_2, được định khung bằng vàng-palladium, rồi được scanning bằng JEOL microscope (JSM-5410LV, Jeol, Tokyo, Nhật Bản) ở 15 kV.

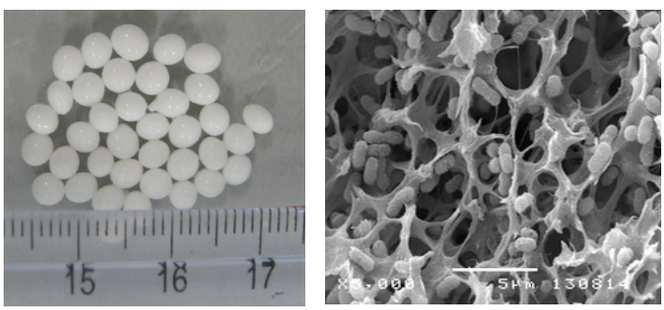
Phương pháp phân tích

Nồng độ của hóa chất được phân tích bằng HPLC và GC/MS đã được mô tả theo nghiên cứu [21]. Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và SPSS 22.0 với mức độ tin cậy là 95% từ phân tích Duncan test.

Kết quả và thảo luận

Khảo sát khả năng phân hủy toluene và chlorotoluene của C. testosterone KT5

Các hạt alginate sau khi hình thành có hình cầu hoặc hơi bầu dục, với kích thước khoảng 3 cm và các hạt có kích thước gần như nhau (hình 1). Các hạt được bảo quản ở nhiệt độ 4^{o}C nếu chưa sử dụng ngay. Kiểm tra sự phát tán của vi khuẩn ra dung dịch trong quá trình cố định cho thấy lượng vi khuẩn thoát ra ngoài môi trường lỏng là $3,6\times10^6$ CFU/ml, tức chỉ chiếm 0,1%. Hình scanning bên trong hạt alginate cho thấy, chúng có các khoang nhỏ để môi trường có thể khuếch tán vào bên trong, vi khuẩn có thể nhận được được ôxy để hoạt động. Trên hình chụp, vi khuẩn dính vào các thành alginate ở các khoang rỗng bên trong. Vi khuẩn sau khi được cố định trong alginate, chúng ít di chuyển nhưng thực hiện được các hoạt động khác, và chúng ít tiếp xúc với các chất trong môi trường hơn.

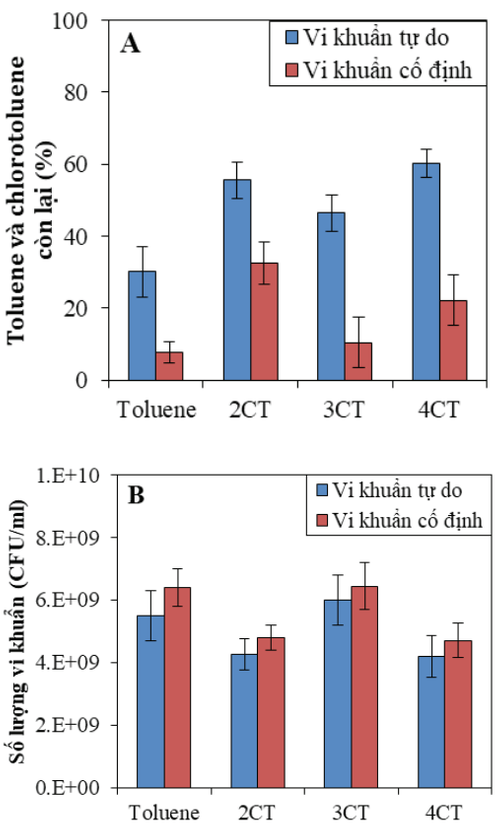


Hình 1. Hình ảnh chụp hạt alginate (trái) và mặt scan cắt ngang của hạt alginate (phải). Hình scan cho thấy vi khuẩn được cố định trong hạt. Hình ảnh hạt alginate bên ngoài và scan cắt ngang ở độ phóng đại tương ứng là 1 và 5.000 lần.

Ở pH=7, vi khuẩn được cố định trong alginate có tốc độ phân hủy cao hơn so với vi khuẩn tự do cho dù chúng có số lượng như nhau. Từ hình 2 cho thấy, tốc độ phân hủy 2CT và 4CT bởi vi khuẩn lơ lửng là như nhau, và chậm hơn so với tốc độ phân hủy 3CT và toluene. Sự phân hủy toluene diễn ra nhanh hơn so với các monochlorotoluene, kết quả này cũng được mô tả từ công bố trước đây được thực hiện bởi Duc (2017) [21]. Sự phân hủy toluene và 2CT, 3CT và 4CT được thực hiện do vi khuẩn cố định có tốc độ khác biệt không đáng kể. Số lượng vi khuẩn sau 12 giờ ủ tăng lên từ 1,22 đến 1,84 lần so với ban đầu. Sau khi ủ, số lượng vi khuẩn trong môi trường có chất dễ phân hủy hơn có phần

nhiều hơn so với môi trường có chất khó phân hủy, nhưng trong môi trường chủng vi khuẩn tự do và vi khuẩn cố định không khác nhau đáng kể (hình 2B). Sau 12 giờ ủ, một số vi khuẩn trong hạt alginate phát tán ra môi trường lỏng. Số lượng này dao động trong khoảng từ 16 đến 20% tổng số vi khuẩn.

Trước đây đã có các dòng vi khuẩn phân hủy chlorotoluene như *Rhodococcus* sp. OCT 10 [1], *Ralstonia* sp. PS12 [23], *Burkholderia*. PS12 [24] và *Achromobacter* sp. KW1 [25] được công bố. Các dòng vi khuẩn khác có khả năng phân hủy toluene nhưng không đề cập đến phân hủy chlorotoluene như một số dòng được phân lập bởi Jacob và Irshaid (2015) từ đất ô nhiễm [26], một số dòng vi khuẩn phân hủy toluene phân lập từ phân bò [27] và mới đây nhất là *Acinetobacter junii* CH005 phân lập từ đất ô nhiễm dầu [28]. Nhưng sự phân hủy của các dòng vi khuẩn này được thực hiện ở dạng tự do và không khảo sát ảnh hưởng của pH cũng như kim loại nặng đến tốc độ phân hủy. Việc khảo sát khả năng phân hủy ở trạng thái cố định và ảnh hưởng của môi trường đến sự phân hủy giúp ta có thể áp dụng trong thực tế.

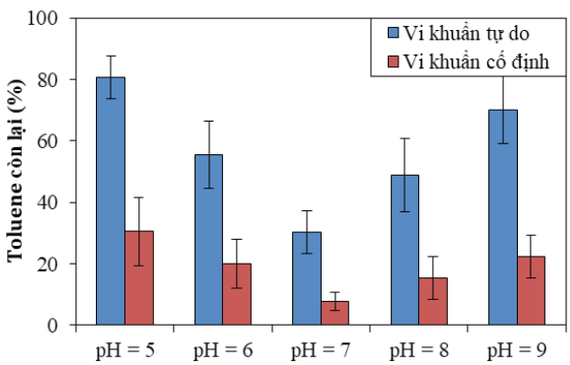


Hình 2. Sự phân hủy toluene và chlorotoluene bởi *C. testosterone* KT5 (A) và số lượng vi khuẩn ở dạng tự do và cố định trong alginate (B). Thí nghiệm được tiến hành trong môi trường lỏng có độ pH=7 với nồng độ hóa chất là 2 mM và thời gian ủ là 12 giờ.

Ảnh hưởng của độ pH đến sự phân hủy toluene bởi vi khuẩn C. testosterone KT5 ở dạng tự do và cố định

Khảo sát sự phân hủy toluene ở các độ pH khác nhau cho thấy, lượng hóa chất còn lại ở các độ pH quá thấp hay quá cao đều nhiều hơn ở độ pH=7 (hình 3), điều này chứng tỏ rằng vi khuẩn khá nhạy cảm với sự thay đổi của pH. Ở các độ pH khác nhau, tốc độ của vi khuẩn cố định đều nhanh hơn so với dạng tự do và sự thay đổi pH ít làm thay đổi tốc độ hơn so với dạng tự do.

Tất cả các trường hợp phân hủy trong môi trường lỏng đã mô tả trên đây cho thấy, vi khuẩn được cố định có tốc độ cao hơn hẳn dạng tự do. Cassidy và ctv cho rằng, sự không tiếp xúc trực tiếp với hóa chất khi được cố định trong alginate giúp giảm tính độc hại đến vi khuẩn, giúp làm tăng tốc độ phân hủy [29].

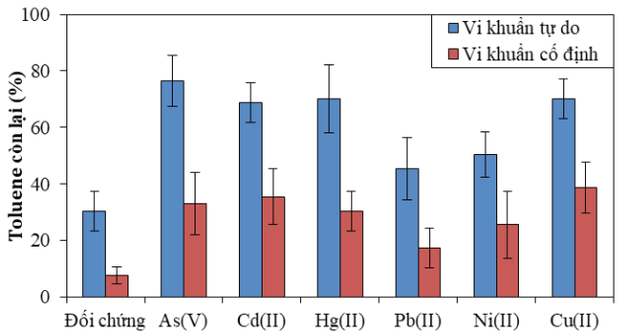


Hình 3. Ảnh hưởng của độ pH đến sự phân hủy toluene của *C. testosterone* KT5 ở dạng tự do và cố định trong alginate. Thí nghiệm được tiến hành ở nồng độ hóa chất là 2 mM và thời gian ủ là 12 giờ.

Ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phân hủy toluene bởi vi khuẩn C. testosterone KT5

Các kim loại nặng có thể tồn tại trong đất hay trong nước và ảnh hưởng đến các hoạt động của vi sinh vật. Kim loại nặng có mặt trong đất đã được khảo sát ở một số địa phương nước ta [30]. Đánh giá mức độ ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phân hủy toluene trong môi trường lỏng cho thấy, vi khuẩn được cố định có tốc độ phân hủy nhanh hơn so với vi khuẩn tự do. Sự cố định trong alginate, lớp alginate bảo vệ cho vi khuẩn giúp chúng giảm được sự độc hại của kim loại nặng so với tiếp xúc trực tiếp trong môi trường lỏng.

Trong số các kim loại nặng được khảo sát, As^{5+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} và Cu^{2+} có mức độ ức chế tương đương nhau. Sự phân hủy toluene, Pb^{2+} và Ni^{2+} cũng có mức độ độc đối với vi khuẩn tương đương và ít hơn so với các kim loại nêu trên (hình 4). Nghiên cứu trước đây được tiến hành bởi Lin và cs (2004) cho thấy, *Mycobacterium* sp. CHXY119 được cố định trong polyvinyl alcohol - alginate cũng có khả năng chịu đựng được với nồng toluene và một số chất hữu cơ khác cao hơn so với dạng tự do [31]. *Mycobacterium* sp.



Hình 4. Ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phân hủy toluene của *C. testosterone* KT5 ở dạng tự do và cố định trong alginate. Thí nghiệm được tiến hành ở nồng độ hóa chất cũng như kim loại nặng là 2 mM và thời gian ủ là 12 giờ.

CHXY119 được cố định cũng ít bị ảnh hưởng bởi kim loại nặng như Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} hơn so với dạng tự do. Kết quả này cho thấy sử dụng dạng cố định có ưu thế hơn khi xử lý ô nhiễm toluene trong các điều kiện môi trường khác nhau.

***Phân hủy toluene và chlorotoluene trong đất bởi vi khuẩn C. testosterone* KT5**

Trong công bố trước đây, *C. testosterone* KT5 dạng tự do đã được khảo sát về khả năng phân hủy toluene và 3CT và 34DCT trong đất. Trong bài báo này, sự phân hủy các chất này cũng được thực hiện nhưng có số lượng vi khuẩn cao hơn. Kết quả cho thấy, với lượng vi khuẩn cao hơn thì tốc độ phân hủy trong đất cao hơn. Chẳng hạn, trong bài báo trước, số lượng vi khuẩn là 10^6 CFU/g đất khô, 78,6±4,7% toluene bị phân hủy sau 15 ngày [21]. Trong thí nghiệm này, với 3,5x10^9 CFU/g đất thì toluene đã hoàn toàn bị phân hủy trong đất sau 10 ngày. Tuy nhiên, sự phân hủy trong đất diễn ra chậm hơn rất nhiều trong môi trường lỏng. Điều này cũng được xác nhận ở bài báo trước. Trong môi trường đất, sự di chuyển tự do của vi khuẩn, cũng như sự khuếch tán chậm của hóa chất và ôxy thường là nguyên nhân chính dẫn đến sự phân hủy chậm hơn ở môi trường lỏng. Ngoài ra, các yếu tố khác như thành phần và kết cấu của đất, độ pH cũng góp phần tạo ra sự khác biệt về tốc độ phân hủy.

Từ bảng 2 có thể thấy rằng, sự chênh lệch về khả năng phân hủy của vi khuẩn cố định và tự do trong đất là không nhiều như trong môi trường lỏng. Mặc dù có thể chịu đựng được độc tố của môi trường tốt hơn so với dạng tự do, nhưng vi khuẩn bị cố định gò bó trong khoảng không gian hẹp hơn nên không được tiếp xúc với môi trường ngoài trong thời gian đầu. Sự khuếch tán hóa chất trong đất bị hạn chế cũng là nguyên nhân làm vi khuẩn bị cố định khó tiếp xúc với hóa chất. Sau khoảng 5-6 ngày, các hạt alginate có hiện tượng vỡ ra hoặc phân hủy một phần. Alginate có nguồn gốc từ các loại tảo nâu (Phaeophyceae) nên việc bị phân hủy là bình thường và góp phần phóng thích vi khuẩn ra môi trường ngoài. Toluene dễ phân hủy trong đất hơn so với các chlorotoluene khác. Một nghiên cứu trước đây cho thấy, cố định vi khuẩn *Pseudomonas* sp UG14Lr trong alginate để phân hủy hóa chất trong đất làm giảm khả năng sống sót và phân hủy so với dạng tự do [32]. Độ ẩm trong đất thấp là yếu tố chính dẫn đến sự giảm sút này [32].

Ở một số nghiệm thức, sự phân hủy của hóa chất trong đất chưa khử trùng nhanh hơn đất đã khử trùng là do hoạt động của vi khuẩn trong đất. Vi khuẩn đã chủng vào môi trường đất chưa khử trùng phân hủy nhanh hơn đất đã khử trùng ở một số trường hợp, chứng tỏ vi khuẩn được chủng có sự cộng tác với vi khuẩn bản địa mà không bị vi khuẩn bản địa cạnh tranh hay ức chế. Trong các nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn, sự giảm lượng hóa chất là không nhiều, chứng tỏ vi khuẩn *C. testosterone* KT5 phát huy được vai trò của chúng.

Bảng 2. Sự phân hủy toluene và chlorotoluene trong đất sau 7 ngày của vi khuẩn *C. testosterone* KT5 dạng tự do và cố định trong alginate.

Nghiệm thức	Toluene và chlorotoluene còn lại trong đất (%)*					
	Alginate không có vi khuẩn		*Vi khuẩn tự do*		*Vi khuẩn cố định*	
	Đất không khử trùng	*Đất đã khử trùng*	*Đất không khử trùng*	*Đất đã khử trùng*	*Đất không khử trùng*	*Đất đã khử trùng*
Toluene	88,3±6,3^{cA}	92,3±3,6^{cA}	35,5±7,3^{abA}	41,2±8,8^{bA}	26,5±6,9^{aA}	40,2±7,7^{bA}
2CT	90,5±4,2^{cA}	96,5±2,7^{cA}	68,5±8,7^{abB}	75,5±8,6^{bB}	53,9±10,0^{aB}	64,5±11,7^{abC}
3CT	91,0±4,0^{cA}	95,0±2,2^{cA}	42,4±11,1^{aA}	65,4±10,2^{bB}	35,7±11,2^{aA}	44,7±8,7^{aAB}
4CT	94,1±3,4^{cA}	94,5±3,8^{cA}	51,1±10,8^{abAB}	61,1±8,4^{bB}	42,5±7,9^{aAB}	61,5±8,7^{bBC}

*: các chữ in thường khác nhau đi kèm với các số thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê trong cùng một hàng và in hoa thể hiện trong cùng một cột. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức p<0,05.

Kết luận

C. testosterone KT5 được phân lập từ đất bị ô nhiễm có khả năng ứng dụng để tẩy sạch toluene và các monochlorotoluene khác tồn dư trong đất và trong nước. Vi khuẩn cố định trong alginate thể hiện khả năng phân hủy vượt trội so với dạng tự do trong điều kiện thường hay khi độ pH thay đổi và sự nhiễm độc của kim loại nặng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D. Dobslaw, K.H. Engesser (2012), "Degradation of 2-chlorotoluene by *Rhodococcus* sp. OCT 10", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93(5)**, pp.2205-2214.

[2] L.H. Keith (1981), "Organic pollutants in water: identification and analysis", *Environ. Sci. Technol.*, **15(2)**, pp.156-162.

[3] R.M. Krill, W.D. Sonzogni (1986), "Chemical monitoring of Wisconsin's ground water", *J. AWWA*, **78**, pp.70-75.

[4] I. Martí, R. Lloret, J. Martín-Alonso, F. Ventura (2005), "Determination of chlorinated toluenes in raw and treated water samples from the Llobregat river by closed loop stripping analysis and gas chromatrography-mass spectrometry detection", *J. Chromatogr. A*, **1077(1),** pp.68-73.

[5] A.D. Nikolaou, G. Golfinopoulos, M.N. Kostopoulou, G.A. Kolokythas, T.D. Lekkas (2002), "Determination of volatile organic compounds in surface waters and treated wastewater in Greece", *Water Res.*, **36(11)**, pp.2883-2890.

[6] J.J. Westrick, J.W. Mello, R.F. Thomas (1984), "The groundwater supply survey", *J. Am. Water Works Assoc.,* **76**, pp.52-59.

[7] B.C.F. Zoeteman, K. Harsen, J.B.H.J. Linders, C.F.H. Morra, W. Slooff (1980), "Persistent organic pollutants in river water and ground water of the Netherlands", *Chemosphere,* **9(4)**, pp.231-249.

[8] S.S. Buhamra (1998), "The analysis of VOCs survey data from residences in Kuwait", *Environmetrics*, **9(1)**, pp.245-253.

[9] D.L. Heikes, S.R. Jensen, M.E. Fleming-Jones (1995), "Purge and trap extraction with GC-MS determination of volatile organic compounds in table-ready foods", *J. Agric. Food. Chem.*, **43(11)**, pp.2869-2875.

[10] U. Brinkmann, W. Reineke (1992), "Degradation of chlorotoluenes by in vivo constructed hybrid strains: problems of enzyme specificity, induction and prevention of *meta*-pathway", *FEMS Microbiol. Lett.*, **75(1)**, pp.81-87.

[11] B.E. Haigler, C.A. Pettigrew, J.C. Spain (1992), "Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150", *Appl. Environ. Microbiol.*, **58(7)**, pp.2237-2244.

[12] M.A. Haro, V. Lorenzo (2001), "Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene", *J. Biotech.*, **85(2)**, pp.103-113.

[13] J.G. Leahy, K.D. Tracy, M.H. Eley (2003), "Degradation of volatile hydrocarbons from steam-classified solid waste by a mixture of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria", *Biotechnol. Lett.*, **25(6)**, pp.479-483.

[14] O.V. Maltseva, I.P. Solyanikova, L.A. Golovleva, M. Schlömann, H.J. Knackmuss (1994), "Dienlacton hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* 1CP: purification and properties", *Arch. Microbiol.*, **162(5)**, pp.368-374.

[15] T. Nishio, A. Patel, Y. Wang, P.C.K. Lau (2001), "Biotransformations catalyzed by cloned p-cymene monooxygenase from *Pseudomonas putida* F1", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55(3)**, pp.321-325.

[16] K. Pollmann, S. Beil, D.H. Pieper (2001), "Tranformation of chlorinated benzenes and toluenes by TecA tetrachlorobenzene dioxygenase and TecB chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Ralstonia* sp. strain PS12", *Appl. Environ. Microbiol.*, **67(9)**, pp.4057-4063.

[17] H. Raschke, M. Meier, J.G. Burken, R. Hany, M.D. Müller, J.R. van der Meer, H.P.E. Kohler (2001), "Biotransformation of various substituted aromatic compounds the chiral dihydrodihydroxy derivatives", *Appl. Environ. Microbiol.*, **67(8)**, pp.3333-3339.

[18] P. Sander, R.M. Wittich, P. Fortnagel, H. Wilkes, W. Francke (1991), "Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, **57(5)**, pp.1430-1440.

[19] P.A. Vandenbergh, R.H. Olsen, J.F. Colaruotolo (1981), "Isolation and genetic characterization of bacteria that degrade chloroaromatic compounds", *Appl. Environ. Microbiol.*, **42(4)**, pp.737-739.

[20] J.S. Yadav, R.E. Wallace, C.A. Reddy (1995), "Mineralization of mono and dichlorobenzenes and simultaneous degradation of chloroand methyl-substituted benzenes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **61(2)**, pp.677-680.

[21] H.D. Duc (2017), "Degradation of chlorotoluenes by *Comamonas testosterone* KT5", *Appl. Biol. Chem.,* **60(4)**, pp.457-465.

[22] M. Schoebitz, H. Simonin, D. Poncelet (2012), "Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads", *J. Microencapsul.,* **29(6)**, pp.532-538.

[23] K. Pollmann, S. Kaschabek, V. Wray, W. Reineke, D.H. Pieper (2002), "Metabolism of dichloromethylcatechols as central intermediates in the degradation of dichlorotoluenes by *Ralstonia* sp. strain PS12", *J. Bacteriol.*, **184(19)**, pp.5261-5274.

[24] A. Lehning, U. Fock, R. Wittich, K.N. Timmis, D.H. Pieper (1997), "Metabolism of chlorotoluenes by *Burkholderia* sp. strain PS12 and toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida* F1: evidence for monooxygenation by toluene and chlorobenzene dioxygenases", *Appl. Environ. Microbiol.*, **63(5)**, pp.1974-1979.

[25] A. Pacholak, W. Smułek, T. Jesionowski, E. Kaczorek (2017), "The ability of *Achromobacter* sp. KW1 strain to biodegrade isomers of chlorotoluene", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **92(8)**, pp.2134-2141.

[26] J.H. Jacob, F.I. Irshaid (2015), "Toluene biodegradation by novel bacteria isolated from polluted soil surrounding car body repair and spray painting workshops", *J. Environ. Prot. Ecol.*, **6(12)**, pp.1417-1429.

[27] R. Rajamanickam, K. Kaliyamoorthi, N. Ramachandran, D. Baskaran, J. Krishnan (2017), "Batch biodegradation of toluene by mixed microbial consortia and its kinetics", *Int. Biodeter. Biodegr.*, **119**, pp.282-288.

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

[29] M.B. Cassidy, H. Lee, J.T. Trevors (1996), "Environmental applications of immobilized microbial cells: A review", *J. Ind. Microbiol.*, **16(2)**, pp.79-101.

[30] Chu Thi Thu Ha (2011), "Survey on heavy metals contaminated soils in Thai Nguyen and Hung Yen provinces in Northern Vietnam", *Journal of Vietnamese Environment*, **1**, pp.34-39.

[31] C.W. Lin, C.H. Wu, H.C. Sun, S.H. Chang (2014), "Alleviation of metal and BTEX inhibition on BTEX degradation using PVA-immobilized degrader: kinetic model of BTEX degradation", *Bioprocess Biosyst. Eng.,* **37(6)**, pp.1085-1093.

[32] S.C. Weir, M.A. Providenti, H. Lee, J.T. Trevors (1996), "Effect of alginate encapsulation and selected disinfectants on survival of and phenanthrene mineralization by *Pseudomonas* sp. UG14Lr in creosote-contaminated soil", *J. Ind. Microbiol.*, **6(1)**, pp.62-67.