

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG LÀM SẠCH TOLUENE TỪ KHÔNG KHÍ TRONG PHÒNG BẰNG TỔ HỢP THỰC VẬT VÀ VI KHUẨN *PSEUDOMONAS PUTIDA* TVA8

Phạm Tuấn Anh¹, Willy Verstraete²

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

²LabMET, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium

TÓM TẮT

Khả năng loại bỏ toluene ở trong không khí của ba loài thực vật khác nhau là *Azalea indica*, *Ficus benjamina* và *Schefflera arboricola* đã được đánh giá dựa trên các thí nghiệm trong bình kín có chứa 100 ppm toluene. Hiệu quả loại bỏ toluene theo ngày cao nhất đạt tới 50% được tìm thấy ở *A. indica*, sau đó là 27% ở *F. benjamina* và thấp nhất là 4% ở *S. arboricola*. Sự kết hợp giữa ba loại thực vật này với chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TVA8 - một chủng vi khuẩn có thể phân giải toluene đã được tiến hành thử nghiệm như một chiến lược làm giàu sinh học về khả năng loại bỏ toluene từ không khí ô nhiễm. Kết quả đã cho thấy, khả năng loại bỏ toluene ở các công thức sử dụng ba loại thực vật mang chủng vi khuẩn *P. putida* TVA8 đều cao hơn so với công thức chỉ sử dụng thực vật không kết hợp với *P. putida* TVA8. Ở công thức có *A. indica*, việc kết hợp với chủng vi khuẩn *P. putida* TVA8 đã làm tăng gấp đôi hiệu quả loại bỏ toluene theo ngày từ 27 lên 50% khi kết hợp với *P. putida* TVA8. Với *F. benjamina*, hiệu quả loại bỏ toluene theo ngày cũng đạt cao hơn từ 27 lên 50% khi kết hợp với *P. putida* TVA8. Sự kết hợp giữa thực vật và chủng *P. putida* TVA8 mang lại hiệu quả loại bỏ toluene tăng cao nhất tới 5 lần được ghi nhận ở công thức sử dụng *S. arboricola*. Các kết quả nghiên cứu bước đầu này cho thấy khả năng có thể sử dụng đối tượng là thực vật hay thực vật và vi sinh kết hợp như một liệu pháp sinh học để giải quyết các vấn đề về ô nhiễm không khí.

Từ khóa: Làm giàu hoạt tính sinh học, làm sạch bằng sinh học, làm sạch bằng thực vật, môi trường không khí, *Pseudomonas putida* TVA8, toluene, xử lý môi trường

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ô nhiễm không khí là vấn đề không chỉ của một vùng, một địa phương mà hiện đã trở thành vấn đề toàn cầu. Nhân loại đang nỗ lực giảm thiểu và loại bỏ tác hại của nó tới môi trường, hệ sinh thái cũng như con người.

Hầu hết mọi người trải qua hơn 90% thời gian của cuộc đời ở trong phòng, nơi có thể chứa một loạt các khí độc như benzene, toluene và formaldehyde gây các chứng bệnh cho con người mà thường được gọi là hội chứng ốm nhà ở (*Sick Building Syndrome*) (Brow *et al.*, 1994; Wargocki *et al.*, 2000). Do sự lưu thông của không khí trong phòng thấp đã dẫn tới sự tích tụ của khí độc, đây chính là lý do làm cho sự ô nhiễm không khí trong nhà thường gây hậu quả nghiêm trọng hơn tới sức khỏe con người so với ô nhiễm không khí bên ngoài.

Lá cây có khả năng hấp thu một số chất ô nhiễm qua lớp cutin và khí khổng trên bề mặt lá khi tiếp xúc với môi trường không khí (Giese *et al.*, 1994; Jen *et al.*, 1995; Keymeulen *et al.*, 1995; Kondo *et*

al., 1996; Omasa *et al.*, 2000; Ugrekheidze *et al.*, 1997). Với sự có mặt của các vi sinh vật cư trú trên thân, lá có khả năng phân giải độc chất thì khả năng làm sạch chất ô nhiễm của thực vật sẽ được cải thiện đáng kể (Crowley *et al.*, 1996; De Kempeneer *et al.*, 2004). Việc tìm hiểu khả năng làm sạch không khí của hệ thực vật là một khuynh hướng mới an toàn, hiệu quả và rẻ hơn so với các phương pháp khác.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thực vật được sử dụng trong thí nghiệm bao gồm: *Azadea indica*, *Ficus benjamina* và *Schefflera arboricola*. Các loại cây này đều là những cây cảnh ưa chuộng trồng trong nhà, được lựa chọn từ nhà kính của Đại học Ghent, Vương quốc Bỉ.

Toluene tinh khiết ($C_6H_5CH_3$) được đặt mua từ hãng Sigma.

Dịch khuẩn dùng trong thí nghiệm là dịch nuôi cấy của *Pseudomonas putida* TVA8 - một dòng vi khuẩn mang operon oxy hóa toluene có thể sử dụng

toluene, benzene, ethylbenzene, phenol và các hợp chất vòng thơm khác như nguồn cung cấp năng lượng và carbon.

Chuẩn bị dịch *P. putida* TVA8: *P. putida* TVA8 được nuôi cấy ở 28°C trong 24 h trên môi trường LB (Luria-Bertani) với thành phần gồm: 5 g NaCl, 5 g bột chiết nấm men và 10 g trypton trong 1 l môi trường. Sau đó, dịch khuẩn được ly tâm (5 phút, 5000 vòng/phút) để tách lấy vi khuẩn. Các tế bào vi khuẩn thu được tiếp tục được chuyển vào nuôi cấy trong môi trường muối khoáng (thành phần gồm: 3 g K₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 10,7 g KNO₃, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, và 0,01 g FeSO₄.7H₂O trong 1 l môi trường) có bổ sung thêm khí toluene với tốc độ 20 ml/phút.

Để tạo các nhánh cây thí nghiệm (*A. indica*, *F. benjamina*, *S. arboricola*) mang *P. putida* TVA8,

dùng dịch khuẩn chứa 10⁶ - 10⁷ CFU/ml của *P. putida* TVA8 phun đều lên hai mặt của lá đến khi tạo thành giọt. Các nhánh cây được để ráo sau đó sử dụng để tiến hành thí nghiệm (Hình 1).

Các thí nghiệm được tiến hành theo mẻ trong các bình kín chứa 100 ppm toluene nhằm đánh giá và so sánh khả năng loại bỏ toluene của ba loại thực vật khác nhau trong không khí ô nhiễm. Các thí nghiệm riêng rẽ cho mỗi loại thực vật được thiết lập nhằm so sánh khả năng loại bỏ toluene của thực vật và thực vật đã được làm giàu bằng quần thể *P. putida* TVA8. Công thức đối chứng không sử dụng thực vật được theo dõi để đánh giá sự suy giảm của nồng độ toluene.

Không khí được lấy mẫu và đo trên máy sắc ký khí GC Varian 3700 để kiểm tra nồng độ toluene.



Hình 1. Bình thí nghiệm mang *Ficus benjamina*.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phản ứng của các loài thực vật khác nhau tới không khí bị ô nhiễm toluene

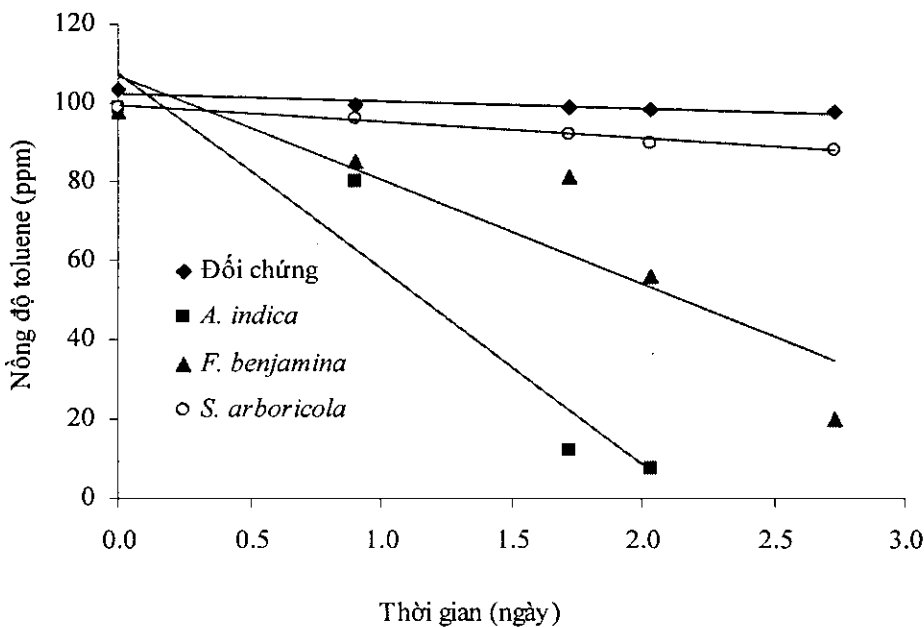
Khả năng loại bỏ toluene của các loài thực vật khác nhau là khác nhau. Nồng độ toluene trong các bình thí nghiệm giảm nhẹ trong ngày đầu tiên ở tất cả các công thức, sau đó giảm mạnh ở ngày thứ 2 với *A. indica* và ngày thứ ba với *F. benjamina*. Sau 4

ngày thí nghiệm, kết quả về sự giảm toluene trong các bình thí nghiệm được thể hiện trên hình 2.

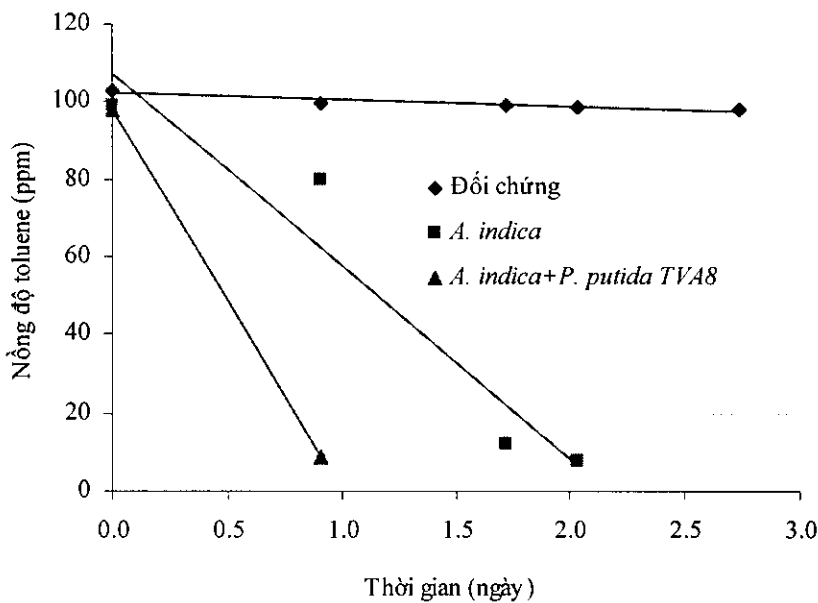
Qua hình 2 ta tính được phần trăm giảm của toluene trên ngày. Sự giảm toluene đạt cao nhất với *A. indica* (50%), sau đó là *F. benjamina* (27%) và thấp nhất ở *S. arboricola* (4%) trong khi sự suy giảm toluene ở đối chứng (bình không mang cây) là 1,8%. Khả năng hấp thu toluene của ba cây thí nghiệm rất khác nhau. Động thái hấp thu xảy ra chủ yếu do sự

khuyết tán khí qua khí khổng ban ngày, và chậm hơn qua cutin cả ngày và đêm (Ugrekheldze *et al.*, 1997). Cường độ hấp thu phụ thuộc vào số lượng khí khổng và cấu trúc của cutin. Các cây trồng khác nhau thì khác nhau về sinh lý và cấu trúc. Vì vậy, số

lượng khí khổng giữa các cây khác nhau thì khác nhau. Sự hấp thu toluene qua cutin của các cây khác nhau còn do sự khác nhau về cấu trúc của lá. Khả năng loại bỏ toluene thấp nhất ở *S. arboricola*, sau đó là *F. benjamina*, và cao nhất ở *A. indica*.



Hình 2. Khả năng loại bỏ toluene của các loài thực vật khác nhau.



Hình 3. Vai trò của *A. indica* trong việc loại bỏ toluene.

Khả năng loại bỏ toluene của *A. indica*

Hàm lượng toluene giảm mạnh ở tất cả các công thức thí nghiệm có *A. indica* so với đối chứng không có *A. indica*. Kết quả thí nghiệm thể hiện qua hình 3.

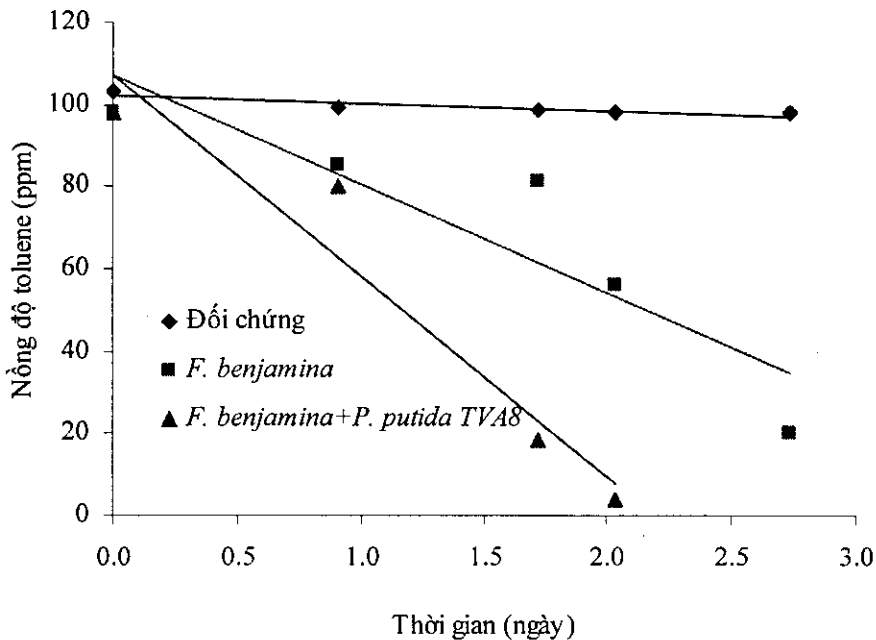
Phản ứng của *A. indica* đối với toluene đã được De Kempeneer và đồng tác giả (2004) đề cập. Từ những kết quả nghiên cứu dễ thấy cây *A. indica* có khả năng loại bỏ khí toluene từ không khí trong phòng. Cơ chế hấp thụ có thể là sự kết hợp giữa hấp thụ qua cutin cả ngày và đêm, cũng như khuếch tán khí vào ban ngày qua khí khổng như Jen và đồng tác giả (1995) đã mô tả cho cây đậu tương (*Glycine max* L.). Khả năng loại bỏ toluene của *A. indica* cũng có thể được giải thích bằng cơ chế trao đổi toluene của các tế bào lá. Thực vật bậc cao có thể mang các enzyme có khả năng giải độc tính của các hợp chất độc (Korte *et al.*, 2000). Một số các loài thực vật có khả năng hút toluene đã được công bố bởi De Kempeneer và đồng tác giả (2004), Keymeulen và đồng tác giả (1995), Ugrehelidze và đồng tác giả

(1997).

So sánh khả năng loại bỏ toluene giữa công thức *A. indica* và công thức *A. indica* kết hợp với *P. putida* TVA8 cho thấy, việc bổ sung *P. putida* TVA8 đã làm tăng gấp đôi khả năng loại bỏ toluene trong không khí. Lượng toluene giảm theo ngày đã đạt tới 100% ở công thức kết hợp giữa *A. indica* và *P. putida* TVA8 so với 50% ở công thức *A. indica* riêng rẽ. Như vậy, hàm lượng toluene giảm trong các công thức thí nghiệm không chỉ do lá *A. indica* hấp thụ mà còn do vi khuẩn *P. putida* TVA8 trên cây phân giải.

Khả năng loại bỏ toluene của *F. benjamina*

Thí nghiệm được tiến hành với cây bình thường và cây có mang *P. putida* TVA8. Kết quả thí nghiệm thể hiện trên hình 4 cho thấy, có một sự giảm hàm lượng toluene đáng kể ở công thức *F. benjamina* kết hợp với *P. putida* TVA8 so với công thức *F. benjamina* không kết hợp với *P. putida* TVA8.



Hình 4. Vai trò của *F. benjamina* trong việc loại bỏ toluene.

F. benjamina có khả năng hút toluene từ không khí bị ô nhiễm. Quá trình này có thể xảy ra qua cutin hay khí khổng (Deinum *et al.*, 1995; Keymeulen *et al.*, 1995; Omasa *et al.*, 2000). Sự đồng hóa các hợp chất hydrocarbon thơm bởi lá cây bao gồm quá trình hấp thụ và biến đổi (Ugrehelidze *et al.*, 1997). Cường độ hấp

thu phụ thuộc vào số lượng khí khổng và cấu trúc của cutin. Quá trình biến đổi được xác định bởi hoạt động của các hệ thống enzyme liên quan.

Việc kết hợp *F. benjamina* với *P. putida* TVA8 - chúng có khả năng phân giải toluene, đã cải thiện khả năng loại bỏ toluene của *F.*

benjamina. Tỷ lệ loại bỏ toluene theo ngày cao nhất ở công thức kết hợp giữa *F. benjamina* với *P. putida* TVA8 (50%), cao hơn hẳn so với công thức chỉ có *F. benjamina* (27%). Kết quả này cho thấy có mối liên quan giữa sự cộng tác của *F. benjamina* và chủng vi khuẩn *P. putida* TVA8 tới hiệu quả loại bỏ toluene.

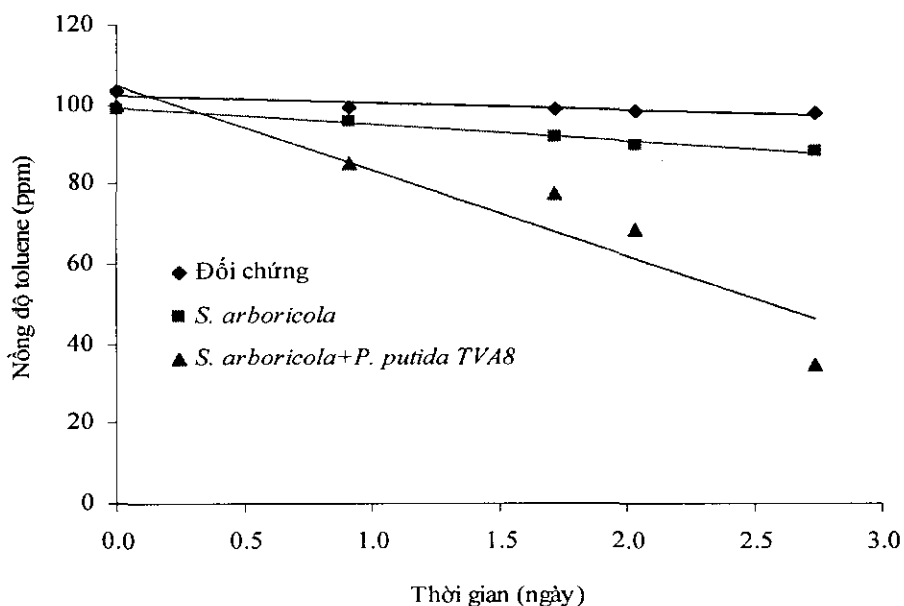
Khả năng loại bỏ toluene của *S. arboricola*

Những nghiên cứu của NASA cho thấy *S. arboricola* loại bỏ các chất ô nhiễm trong không khí do các cây trồng khác tiết ra, hay do con người và công nghiệp thải ra rất hiệu quả. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy khả năng loại bỏ toluene của *S. arboricola* rất hạn chế.

Khả năng loại bỏ toluene của *S. arboricola* và *S.*

arboricola kết hợp *P. putida* TVA8 được thể hiện trên hình 5.

Có sự khác nhau rõ rệt về việc giảm hàm lượng toluene giữa hai công thức có kết hợp với *P. putida* TVA8 và không kết hợp với *P. putida* TVA8. Sự kết hợp giữa vi khuẩn *P. putida* TVA8 và *S. arboricola* có hiệu quả loại bỏ toluene rất cao so với *S. arboricola* riêng rẽ. Hàm lượng toluene giảm theo ngày có thể đạt tới 22% ở công thức kết hợp giữa *S. arboricola* và *P. putida* TVA8 trong khi ở công thức xử lý bằng *S. arboricola* chỉ đạt 4%. Cũng giống như trường hợp của *A. indica* và *F. benjamina* ở trên, việc làm giàu *P. putida* TVA8 lên bề mặt lá của *S. arboricola* đã làm tăng sự loại bỏ toluene. Như vậy, sự hiện diện của *P. putida* TVA8 trên lá *S. arboricola* đã có tác dụng tích cực và làm tăng tới 5 lần hoạt lực loại bỏ toluene.



Hình 5. Vai trò của *S. arboricola* trong việc loại bỏ toluene.

KẾT LUẬN

Khả năng và mức độ hấp thu toluene của ba loại thực vật khác nhau sử dụng trong thí nghiệm rất khác nhau, trong đó khả năng hấp thu toluene cao nhất ở *A. indica*, sau đó là *F. benjamina* và thấp nhất ở *S. arboricola*.

Việc kết hợp giữa thực vật và chủng vi khuẩn *P.*

putida TVA8 đã làm tăng 2 - 5 lần hoạt lực loại bỏ toluene ra khỏi môi trường không khí so với trường hợp chỉ sử dụng thực vật riêng rẽ trong đó *S. arboricola* cho kết quả cao nhất.

Lời cảm ơn: Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn của mình tới cơ quan cấp học bổng VLIR và Trung tâm Vệ sinh Môi trường (CES) - Đại học Ghent, Vương quốc Bỉ đã cấp học bổng và hỗ trợ cho tôi thực hiện

những nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Brow SK, Sim MR, Abramson MJ, Gray CN (1994) Concentration of volatile organic compounds in indoor air - a review. *Indoor Air-Int. J Indoor Air Qual Clim* 4: 123-134.
- Crowley DE, Brennerova MV, Irwin CI, Brenner V, Focht DD (1996) Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol Ecol* 20(2): 79-89.
- De Kempeneer L, Sercu B, Vanbrabant W, Van Langenhove H, Verstraete W (2004) Bioaugmentation of the phyllosphere for the removal of Toluene from indoor air. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(2): 284-288.
- Deinum G, Baart AC, Bakker DJ, Duyzer JH, Van den Hout KD (1995) The influence of uptake by leaves on atmospheric deposition of vapor-phase organics. *Atmospheric Environment* 29(9): 997-1005.
- Giese M, Bauer-Doranth U, Langebartels C, Sandermann H (1994) Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) cell-suspension cultures. *Plant Physiol* 104: 1301-1309.
- Jen MS, Hoylman AM, Edwards NT, Walton BT (1995) Experimental method to measure gaseous uptake of C¹⁴ Toluene by foliage. *Environ Exp Bot* 35: 389-398.
- Keymeulen R, Schamp N, Van Langenhove H (1995) Uptake of gaseous Toluene in plant leaves: a two compartment model. *Chemosphere* 31(8): 3961-3975.
- Kondo T, Hasegawa K, Uchida R, Onishi M, Mizukami A, Osama K (1996) Absorption of atmospheric formaldehyde by deciduous broad-leaved, evergreen broad-leaved and coniferous tree species. *Bull Chem Soc Jpn* 69: 3673-3679.
- Korte F, Kvesitadze G, Ugrekhelidze D, Gordeziani M, Khatisashvili G, Buadze O, Zaalishvili G, Coulston F (2000) Organic toxicants and plants - a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 47(1): 1-26.
- Omasa K, Tobe K, Hosomi M, Kobayashi M (2000) Absorption of ozone and seven organic pollutants by *Populus nigra* and *Camellia sasanqua*. *Environ Sci Technol* 34: 2498-2500.
- Ugrekhelidze D, Korte F, Kvesitadze G (1997) Uptake and transformation of benzene and Toluene by plant leaves. *Ecotoxicol Environ Saf* 37: 24-29.
- Wargocki P, Wyon DP, Sundell J, Clausen G, Fanger PO (2000) The effects of outdoor air supply rate in an office on perceived air quality, Sick Building Syndrome (SBS) symptoms and productivity. *Indoor Air-Int. J Indoor Air Qual Clim* 10: 222-236.

STUDY OF THE TOLUENE REMOVAL ABILITY FROM INDOOR AIR OF THE COMBINATION BETWEEN PLANTS AND *PSEUDOMONAS PUTIDA* TVA8 STRAIN

Pham Tuan Anh^{1,*}, Willy Verstraete²

¹Centre of Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Vietnam

²LabMET, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium

SUMMARY

The removal of airborne toluene by three plant species including *Azalea indica*, *Ficus benjamina* and *Schefflera arboricola* was investigated in closed reactors contaminated 100 ppm of toluene by batch experiments. The toluene removal efficiency per day to gaseous toluene was the highest for *A. indica* (50%), then for *F. benjamina* (27%) and the lowest for *S. arboricola* (4%). The combination between three these plants and *Pseudomonas putida* TVA8 - a toluene degrading strain was tested as bioaugmentation strategy to remove gaseous toluene from contaminated air. The results showed that the toluene removal of treatments applied inoculated plants by *P. putida* TVA8 were higher than of the treatments contained single plants without inoculation. The toluene removal efficiency of *A. indica* with inoculation of *P. putida* TVA8 was twice than *A. indica* without *P. putida* TVA8 and increased from 50 to 100% per day. For *F. benjamina*, the toluene removal ability increased from 27 to 50% per day with

* Author for correspondence: Tel: 84-4-982190075; Fax: 84-4-8545952; E-mail: pta.nguyen@gmail.com

inoculation of *P. putida* TVA8. The highest toluene removal efficiency was 5 times indicated for *S. arboricola* inoculated by *P. putida* TVA8 compared to *S. arboricola* without inoculation. These initial results indicated that plants and plants coordinated with bacteria may have potential to introduce as a biological remedy for air pollution treatment.

Keywords: *Air, bioaugmentation, bioremediation, environmental treatment, phytoremediation, Pseudomonas putida TVA8, toluene*