

PHÂN GIẢI CARBAZOLE CỦA MẪU LÀM GIÀU ER07 TỪ ĐẤT NHIỄM DIOXIN TẠI SÂN BAY BIÊN HÒA

Phạm Thị Huệ¹, Ngô Thị Thúy Hương², Nguyễn Quốc Định³, Trần Hữu Phong²
Nguyễn Kim Nữ Thảo¹, Nguyễn Hồng Minh^{2,4*}

¹ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Khoa Công nghệ Sinh học, Hóa học và Kỹ thuật Môi trường, Trường Đại học Phenikaa

³ Phòng Hợp tác Đối ngoại, Trường Đại học Phenikaa

⁴ Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa

*Email: minh.nguyenhong@phenikaa-uni.edu.vn

Ngày nhận bài: 23/12/2022; ngày hoàn thành phản biện: 27/12/2022; ngày duyệt đăng: 27/12/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phát triển hệ vi sinh vật có khả năng phân giải carbazole từ mẫu đất nhiễm dioxin tại sân bay Biên Hòa, Việt Nam. Sau 7 lần làm giàu, mẫu ER07 có khả năng phân giải carbazole hiệu quả. Trong môi trường M63-Car, ER07 có thể phân giải 95,2% carbazole sau 144 giờ nuôi cấy. ER07 duy trì khả năng phân giải carbazole khi được nuôi cấy trên môi trường tối thiểu tốt hơn khi nuôi cấy trên môi trường Tryptone Soya Broth giàu dinh dưỡng. Đồng thời, trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của D-glucose ở nồng độ 0,25; 0,5 và 5 g/L đến khả năng phân giải carbazole đã được đánh giá. Kết quả cho thấy khi không có mặt D-glucose, hệ vi sinh vật ER07 có hiệu quả xử lý carbazole tốt nhất. Mặt khác, hỗn hợp 2 chủng *Mycolicibacterium iranicum* ER07-1 và *Conexibacter stalactiti* ER07-2 có khả năng phân giải carbazole trong mẫu ER07 đã được xác định. Do đó, hệ vi sinh vật ER07 có tiềm năng ứng dụng trong xử lý môi trường đất bạc màu, nhiễm carbazole và hợp chất vòng thơm PAHs khác.

Từ khóa: Đất nhiễm dioxin, hệ vi sinh vật, phân hủy carbazole, xử lý sinh học.

1. MỞ ĐẦU

Carbazole ($C_{12}H_9N$) là một loại hydrocarbon thơm đa vòng (PAHs – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), được tạo ra do quá trình đốt cháy không hoàn toàn các hợp chất hữu cơ chứa nitrogen trong sản xuất và sinh hoạt [1]. Ở nồng độ thấp, carbazole được sử dụng làm nguyên liệu trong y tế, dược phẩm và sản xuất thuốc nhuộm. Tuy nhiên khi ở nồng độ cao, carbazole trở thành tác nhân gây ô nhiễm môi trường và độc

học sinh thái [2]. Phân tử carbazole được cấu tạo từ hai vòng benzene và một vòng pyrol. Carbazole có đặc điểm hóa học và độc học của các PAHs cấu tạo từ nhiều vòng benzene hợp nhất (như pyrene, phenanthrene và anthracene) và các hợp chất dị vòng [1]. Đặc tính khó phân hủy, ưa béo và kỵ nước giúp hợp chất này có khả năng liên kết linh hoạt với đất sét và chất mùn dẫn đến tồn lưu lâu dài trong đất, nước và trầm tích [3]. Thêm vào đó, nguyên tử N giàu điện tử giúp carbazole dễ dàng tham gia các phản ứng thế tạo thành các dẫn xuất đa halogen có cấu trúc phân tử và độc tính tương tự dioxin [4]. Carbazole không tồn tại đơn lẻ trong tự nhiên. Hợp chất này được phát hiện ngẫu nhiên trong các mẫu phân tích hydrocarbon gây ô nhiễm và thuốc trừ sâu, hoặc được phát hiện với vai trò là chất trung gian khi phân tích hydrocarbon thơm đa vòng (PAHs), polychlorinated dioxin và furan (PCDD/Fs) và polychlorinated biphenyls (PCB) [3].

Nhằm xử lý các khu vực ô nhiễm có chứa carbazole, xử lý sinh học bằng hệ vi sinh vật là một trong những phương pháp được quan tâm nghiên cứu những năm gần đây bên cạnh các phương pháp xử lý nhiệt, phân hủy quang học và oxy hóa hóa học tốn kém và giới hạn về quy mô [3]. Vi sinh vật với khả năng chuyển hóa carbazole thành các hợp chất không độc hoặc ít độc hơn đã được ghi nhận trong nhiều báo cáo [3, 5]. Vi sinh vật phá vỡ cấu trúc carbazole thông qua quá trình oxy hóa bên và oxy hóa góc nhờ hoạt động của các enzyme như dioxygenase xúc tác phản ứng hydroxyl hóa carbazole thành 3-hydroxycarbazole [1, 6]. Bên cạnh đó, hệ enzyme đa thành phần carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) tham gia vào quá trình chuyển hóa carbazole, dioxin và các hợp chất PAH khác [7-11]. Quá trình phân hủy carbazole là quá trình phức tạp cần sự tham gia của nhiều enzyme của nhiều vi sinh vật khác nhau. Do đó, trong các báo cáo gần đây, các nhà khoa học kết hợp các chủng đơn lẻ nhằm tăng hiệu quả xử lý carbazole [12-14]. Đồng thời, việc làm giàu hệ vi sinh vật tại vị trí ô nhiễm cũng được quan tâm nghiên cứu nhằm chọn lọc những hệ vi sinh vật vừa có hiệu quả phân hủy carbazole và các hợp chất tương tự, vừa có khả năng thích nghi cao với điều kiện bản địa [15, 16].

Trong chiến tranh Việt Nam, quân đội Mỹ đã tập kết và làm rò rỉ dioxin tại một số sân bay quân sự ở miền Trung và miền Nam. Theo thời gian, các sân bay này trở thành nguồn làm giàu tự nhiên cho các nhóm vi sinh vật có khả năng phân giải dioxin và các hợp chất vòng thơm tương tự dioxin, ví dụ như carbazole. Trong nghiên cứu này, mẫu đất nhiễm dioxin tại sân bay quân sự Biên Hòa được làm giàu sử dụng carbazole là nguồn carbon duy nhất. Khả năng phân hủy carbazole của mẫu làm giàu được đánh giá ở quy mô phòng thí nghiệm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập và xử lý mẫu đất

Mẫu đất FC2-PL4 sử dụng trong thí nghiệm được lấy ở độ sâu 10 – 20 cm tại khu Pacer Ivy, phía Tây Nam sân bay Biên Hòa. FC2-PL4 có độ độc TEQ_{WHO} của dioxin là 1154 ppt. Mẫu được thực hiện thí nghiệm nuôi cấy làm giàu sau 48 giờ bảo quản 4°C kể từ thời điểm lấy mẫu thực nghiệm.

2.2 Làm giàu tổ hợp vi sinh vật đất có khả năng phân giải carbazole

Mẫu đất FC2-PL4 được lắc đều trong 10 mL NaCl 0,9 % với tốc độ 200 rpm ở 30°C trong 20 giờ để tế bào vi sinh vật được khuếch tán đều trong dung dịch. Mẫu được để lắng tự nhiên trong 20 phút ở 30°C giúp loại bỏ chất rắn có kích thước lớn. Sau đó, 5 mL dịch huyền phù được chuyển sang 15 mL môi trường khoáng M63-Car (g/L: KH₂PO₄ – 136, 1 mL MgSO₄ 1 M, FeSO₄.7H₂O – 0,0005, (NH₄)₂SO₄ – 2, Carbazole – 0,2). Đây được ký hiệu là mẫu làm giàu lần 1 (ER01). Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 rpm ở 30°C, 5 mL dịch của bình làm giàu lần 1 được chuyển tiếp sang 15 mL môi trường M63-Car mới (ER02). Mẫu được làm giàu 7 lần đến khi môi trường có màu nâu cho thấy sự phân hủy của carbazole. Tổ hợp vi sinh vật trong mẫu làm giàu từ lần 1 đến lần 7 được ký hiệu lần lượt từ ER01 đến ER07. Mẫu được bảo quản ở -80°C trong glycerol 15% có bổ sung carbazole 0,1 g/L.

Trong một thí nghiệm khác, mẫu ER07 được nuôi trong 15 mL môi trường dịch thể TSB-Car (g/L: casein peptone- 3,4, KH₂PO₄ – 0,5, D-glucose – 0,5, NaCl – 1, soya peptone – 0,6, carbazole – 0,2) lắc 200 rpm ở 30°C trong 72 giờ. Mẫu làm giàu này được ký hiệu ER07-TSB.

2.3. Đánh giá khả năng phân giải carbazole của mẫu làm giàu

Mẫu ER07 và ER07-TSB được hoạt hóa lần lượt trong 20 mL môi trường M63-Car và TSB-Car, với tốc độ lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 72 giờ. Tế bào thu được sau khi ly tâm 8000 vòng/phút trong 15 phút được rửa bằng DMSO 20%. Sau đó, tế bào được bổ sung vào 20 mL môi trường M63-Car với mật độ OD₆₀₀ = 0,01. Bình môi trường chứa mẫu làm giàu ER07 và ER07-TSB được nuôi cấy với tốc độ lắc 200 vòng/phút ở 30°C. Nồng độ carbazole tổng số được xác định tại thời điểm 0; 72 và 144 giờ. Kết quả của thí nghiệm được đánh giá từ dãy số liệu của ít nhất 3 lần lặp lại thí nghiệm độc lập. Độ tin cậy được đánh giá bằng kiểm định student's t-test.

Trong một thí nghiệm khác, khả năng phân giải carbazole của các vi sinh vật trong mẫu ER07 và ER07-TSB được đánh giá bằng phương pháp cấy trải trên đĩa thạch. Mẫu ER07 và ER07-TSB được pha loãng đến nồng độ pha loãng 10⁻⁶. Sau đó, mẫu pha loãng của ER07 và ER07-TSB được cấy trải trên môi trường thạch M63-Car. Ủ đĩa vi

khuẩn ở 30°C trong 7 ngày đến khi quan sát thấy vòng phân giải carbazole trên đĩa thạch.

2.4. Đánh giá ảnh hưởng của D-glucose đến tốc độ phân giải carbazole

Mẫu làm giàu ER07 được kiểm tra khả năng phân giải carbazole trong môi trường M63-Car bổ sung D-glucose các nồng độ 0,25; 0,5 và 5 g/L. Nồng độ carbazole tổng số được theo dõi theo thời gian trong 144 giờ.

2.5. Phương pháp xác định nồng độ carbazole

Carbazole tổng số trong môi trường được tách chiết với dung môi hữu cơ dichloromethane tỉ lệ 1:1 (v/v) lặp lại 3 lần ở 30°C. Sau khi cô khô sản phẩm tách, mẫu được bảo quản ở 4°C. Mẫu chứa carbazole được hòa tan trong dung môi dimethyl sulfoxide. Nồng độ carbazole trong môi trường được xác định dựa trên phương pháp đo độ hấp thụ tại bước sóng 261 nm (A_{261}) bằng máy UV-Vis (UV/Vis Spectrophotometer 6850, Jenway, model: 6850).

2.6. Phương pháp phân lập chủng vi sinh vật phân giải carbazole

Vi sinh vật phân giải carbazole được phân lập bằng cách pha loãng cấy trải trên đĩa thạch. 1 mL ER07 được pha loãng lên tiếp bậc 10 sáu lần bằng NaCl 0,9%. Dung dịch pha loãng được lắc với 0,001% Tween80, 200 rpm ở 30°C. Sau 4 giờ, 100 μ L dịch tế bào được cấy trải trên môi trường M63-car, ở 30°C trong 14 ngày. Vi sinh vật phân giải carbazole sẽ tạo vòng trong quanh vùng sinh trưởng. Các chủng vi sinh vật này được tinh sạch nhiều lần trên M63-Car và cuối cùng tinh sạch lại trên môi trường TSB-Car đến khi thu được chủng thuần.

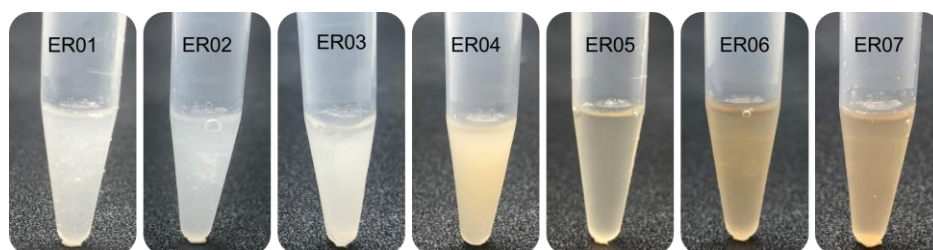
2.7. Phương pháp phân tích trình tự 16S rRNA và dựng cây phân loại

Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường TSB ở 200 rpm, 30°C trong 72 giờ. Ly tâm 10000 rpm trong 10 phút thu tế bào. DNA tổng số của chủng vi khuẩn được tách chiết bằng kit tách thương mại E.N.Z.A Bacterial DNA kit (Omega, Mỹ). DNA được giải trình tự toàn bộ hệ gen trên hệ thống Hi-seq bởi công ty Macrogen, Hàn Quốc. Kết quả sau khi xử lý được chú giải bằng Prokka. Trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn được BLAST trên cơ sở dữ liệu EzBioCloud. Cây phát sinh loài Neighbor-Joining được xây dựng trên thư viện 16S rRNA, sử dụng công cụ MEGA11, giá trị bootstrap 1000.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng phân giải carbazole của mẫu làm giàu ER07

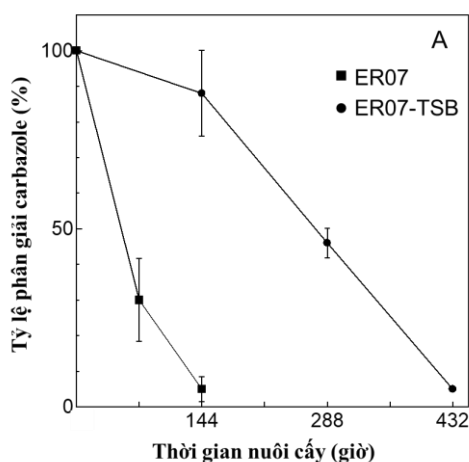
Với mục đích làm giàu tổ hợp vi sinh vật có khả năng phân giải carbazole từ mẫu đất FC2-PL4 nhiễm dioxin tại sân bay Biên Hòa, Đồng Nai, môi trường khoáng M63 có chứa 200 ppm carbazole được sử dụng. Carbazole được bổ sung với nồng độ cao (200 ppm) có màu trắng đục và hình thành dạng tinh thể không tan trong nước. Các mẫu làm giàu từ ER01 đến ER03 vẫn quan sát thấy tinh thể carbazole trong môi trường nuôi cấy (Hình 1). Sự phân giải carbazole được quan sát thấy từ ER04 khi môi trường M63-Car đổi màu từ trắng đục sang màu vàng nâu (ER05) do màu của các chất chuyển hóa trung gian trong quá trình phân giải carbazole. Màu vàng đậm dần trong mẫu ER06 và ER07. Kết quả này phù hợp với mô tả trước đây của chúng tôi [17]. Do đó, mẫu làm giàu ER07 được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hình ảnh mẫu làm giàu trong 7 thế hệ liên tiếp: ER01, ER02, ER03, ER04, ER05, ER06 và ER07 từ mẫu đất FC2-PL4 nhiễm dioxin tại sân bay Biên Hòa, Đồng Nai. Mẫu được nuôi cấy trong môi trường M63-Car, 7 ngày ở 30°C với điều kiện lắc 200 rpm.

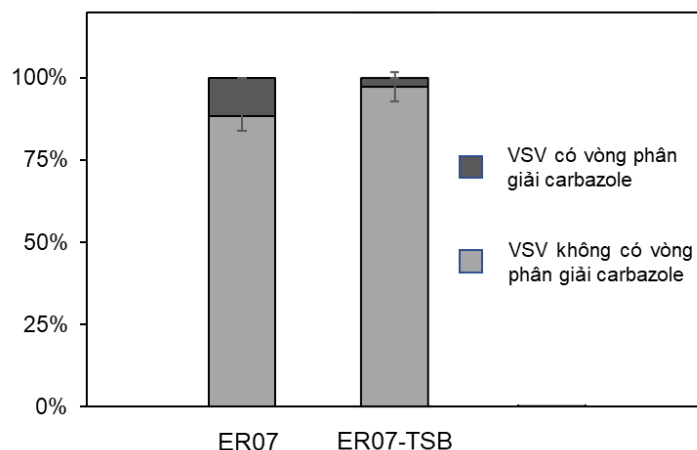
Khả năng phân giải carbazole mẫu làm giàu ER07 được thể hiện trong Hình 2. Tổ hợp vi sinh vật của mẫu làm giàu ER07 có khả năng phân hủy 95,2% carbazole tổng số trong môi trường sau 144 giờ nuôi cấy. Khi quan sát màu sắc thay đổi của môi trường nuôi cấy, môi trường chuyển từ trắng đục do tinh thể carbazole lơ lửng trong môi trường sang môi trường dịch trong do tinh thể carbazole hầu hết đã phân giải và có màu vàng đến nâu do các chất trung gian được sinh ra trong quá trình phân giải carbazole. Nhóm nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Hạnh (2009) đã làm giàu hệ vi sinh vật DN533 phân giải một số PAHs, trong đó có carbazole, từ đất nhiễm dioxin. DN533 có thể sử dụng hơn 50% của carbazole 100 ppm được bổ sung sau 120 giờ trên môi trường khoáng [18]. Theo báo cáo của nhóm tác giả Nguyễn Hồng Minh và cộng sự (2009), hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. R03 và *Achromobacter* sp. R05 được phân lập từ đất nhiễm dioxin tại sân bay Đà Nẵng có khả năng phân hủy 70% của carbazole 100 ppm sau 120 giờ nuôi cấy trên môi trường tối thiểu [19]. Như vậy, tổ hợp vi sinh vật ER07 được làm giàu từ mẫu đất nhiễm dioxin FC2-PL4 có khả năng phân hủy carbazole tốt hơn so với chủng vi sinh vật đơn và tổ hợp vi sinh vật làm giàu đã báo cáo trước đây. Bên cạnh đó, tỷ lệ phân giải carbazole tại các điểm khảo sát trong

nghiên cứu này là số liệu trung bình của ba lần lặp lại độc lập. Kết quả cho thấy sự phân hủy carbazole ổn định của mẫu làm giàu ER07 theo thời gian (Hình 2).



Hình 2. Tỷ lệ phân giải carbazole tổng số của mẫu làm giàu ER07 và ER07-TSB trong môi trường M63-Car ở 30°C với điều kiện lắc 200 rpm.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi so sánh khả năng phân giải của mẫu làm giàu ER07 được duy trì trong môi trường tối thiểu, chỉ bổ sung carbazole là nguồn carbon duy nhất và mẫu làm giàu ER07-TSB đã được nuôi cấy trên môi trường phức hợp gồm nhiều nguồn dinh dưỡng và carbon. Kết quả của chúng tôi chỉ ra rằng mẫu làm giàu ER07 có tốc độ phân giải carbazole nhanh gấp 3 lần so mẫu làm giàu ER07-TSB (Hình 2). Mẫu làm giàu ER07-TSB phân giải được 11,6% carbazole tổng số, trong khi đó, ER07 phân giải 95,2% carbazole tổng số sau 144 giờ khi nuôi cấy trong môi trường M63-Car (Hình 2). Tốc độ phân giải carbazole của ER07-TSB khá chậm trong 144 giờ đầu tiên, và tăng nhanh chóng sau 288 giờ. Mẫu làm giàu ER07-TSB có thể phân giải 95,1% carbazole tổng số sau 432 giờ.



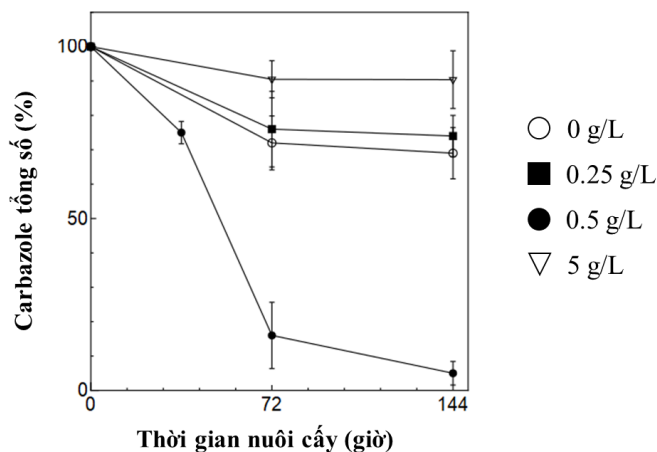
Hình 3. Vi sinh vật tổng số trong mẫu ER07 và ER07-TSB khi cấy trải trên môi trường M63-Car ủ ở 30°C trong 7 ngày.

Kết quả cấy trải của ER07 cho thấy số lượng vi sinh vật phân giải carbazole (có vòng trong xung quanh khuẩn lạc) là $7,4 \times 10^7$ CFU/mL, chiếm 11,7% trong tổng số $6,3 \times 10^8$ CFU/mL vi sinh vật phát triển trên đĩa thạch (Hình 3). Những vi sinh vật có hoạt tính phân giải carbazole này giúp ER07 có tốc độ phân giải cao trong môi trường chỉ có carbazole là nguồn carbon duy nhất. Đối với mẫu làm giàu ER07-TSB, số lượng vi sinh vật có vòng phân giải chiếm 2,7% trong tổng số $5,2 \times 10^8$ CFU/mL vi sinh vật, tỷ lệ này ít hơn 4,3 lần so với trong ER07 (Hình 3). Kết quả, ER07-TSB cần thời gian thích nghi trong 144 giờ đầu nuôi cấy với tốc độ phân giải chậm và cần 432 giờ để phân giải hầu hết carbazole trong môi trường (Hình 2). Kết quả này của chúng tôi chỉ ra rằng, đối với việc duy trì tổ hợp vi sinh vật trong mẫu làm giàu có hoạt tính phân giải carbazole ổn định, môi trường tối thiểu chứa carbazole là nguồn carbon duy nhất sẽ là lựa chọn tốt hơn nuôi cấy trong môi trường giàu dinh dưỡng hoặc nuôi cấy xen kẽ. Việc nuôi cấy trong môi trường giàu dinh dưỡng sẽ làm giảm tỉ lệ vi sinh vật phân giải carbazole trong tổ hợp vi sinh vật của mẫu làm giàu, do đó làm giảm hoạt tính và hiệu quả xử lý carbazole trong môi trường.

3.2. Ảnh hưởng của D-glucose đến khả năng phân giải carbazole

Mẫu làm giàu ER07 được đánh giá khả năng phân giải carbazole trong trường hợp có mặt một nguồn carbon khác trong môi trường nuôi cấy. Trong thí nghiệm này, D-glucose được sử dụng làm nguồn carbon thử nghiệm. Sau 144 giờ nuôi cấy, tỉ lệ phân giải carbazole của ER07 đạt 26,3%, 31,1% và 9,6% khi môi trường bổ sung D-glucose với nồng độ lần lượt là 0,25; 0,5 và 5 g/L (Hình 4). Trong khi đó, trong môi trường không bổ sung D-glucose, ER07 có thể phân hủy 95,2% carbazole tổng số sau 144 giờ nuôi cấy. Kết quả này cho thấy, trong điều kiện có nguồn carbon dễ phân giải, hiệu quả phân giải carbazole của mẫu làm giàu bị suy giảm (Hình 4). Và ngược lại, khi không có mặt nguồn carbon dễ phân giải, mẫu làm giàu ER07 có hiệu quả xử lý

carbazole tốt nhất. Trong thực tế, khu vực ô nhiễm carbazole thường được phát hiện ô nhiễm các hợp chất PAHs khác, và các chất dinh dưỡng dễ hấp thụ như D-glucose ở mức rất thấp [3, 20]. Do đó, mẫu làm giàu ER07 có tiềm năng để ứng dụng xử lý carbazole trong điều kiện in vivo tại khu vực đất bạc màu, nghèo dinh dưỡng như sân bay quân sự Biên Hòa.



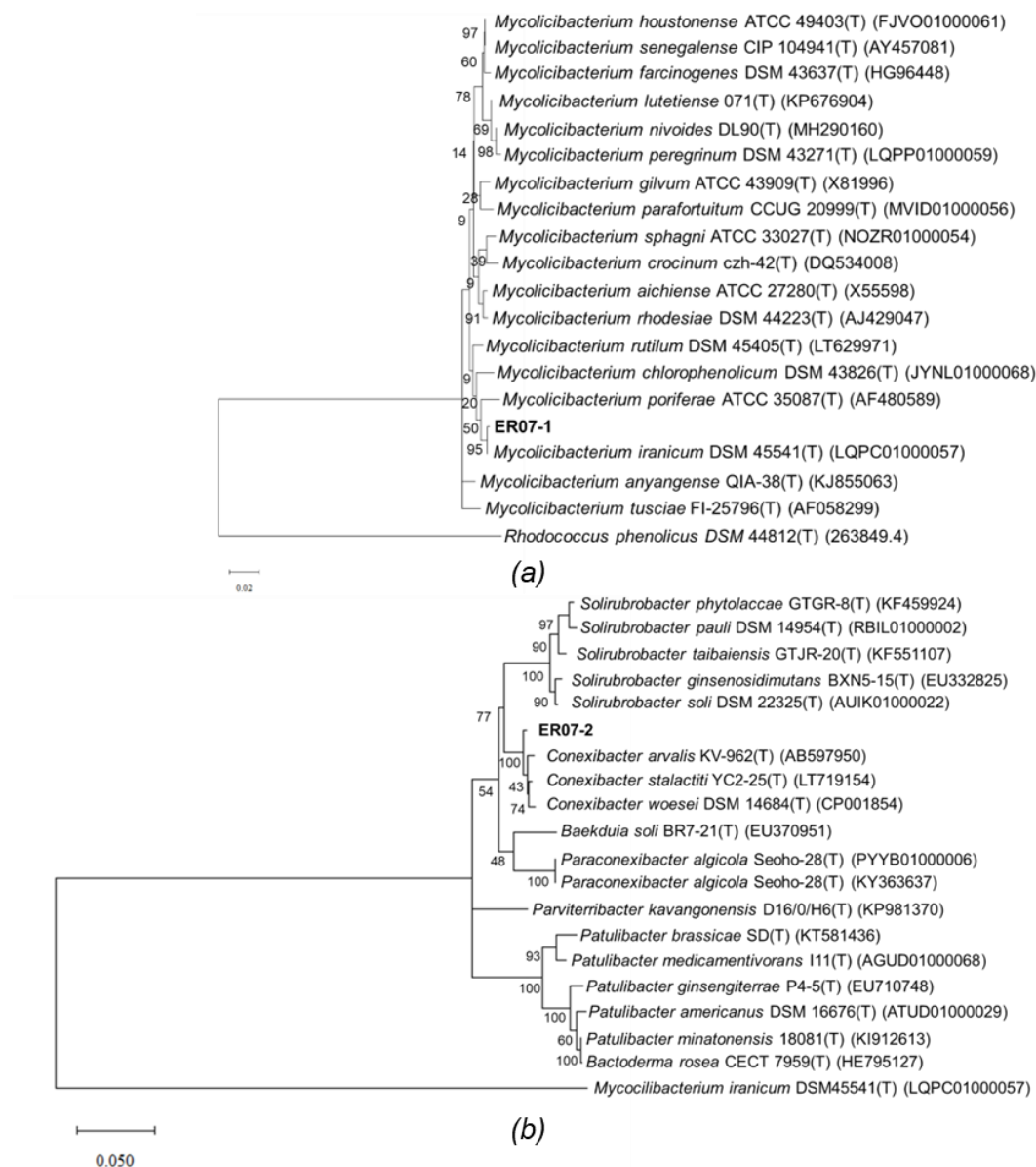
Hình 4. Tỷ lệ phân giải carbazole tổng số của mẫu làm giàu ER07 trong môi trường M63-Car và môi trường M63-Car có bổ sung 0,25; 0,5 và 5 g/L D-glucose.

3.3. Chứng vi sinh vật phân giải carbazole trong mẫu làm giàu ER07

Nhằm tìm kiếm chủng vi sinh vật có vai trò quan trọng phân giải carbazole của mẫu ER07, chúng tôi tiến hành phân lập vi sinh vật trong mẫu làm giàu ER07 với carbazole là nguồn carbon duy nhất. Sau 11 lần tinh sạch liên tiếp trên môi trường M63-Car, một khuẩn lạc tiềm năng được lựa chọn. Khuẩn lạc có màu vàng cam, tròn, bề mặt trơn nhầy, tâm lõm, rìa tỏa tròn và tạo vòng phân giải tốt carbazole trên đĩa thạch. Tuy nhiên, kết quả phân tích trình tự toàn bộ hệ gen cho thấy, đây là hỗn hợp của 2 chủng vi sinh vật khác nhau với trình tự 16S rRNA khác nhau được ký hiệu là ER07-1 và ER07-2. Phân tích cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự 16S rRNA cho thấy, chủng ER07-1 có quan hệ gần gũi với chi vi khuẩn *Mycolicibacterium* (Hình 5a). Trong đó, chủng có độ tương đồng cao nhất (99,86%) với chủng *Mycolicibacterium iranikum* DSM 45541 (T). Chủng ER07-2 có quan hệ gần gũi với chi *Conexibacter* và *Solirubrobacter* (Hình 5b). ER07-2 có trình tự 16S rRNA tương đồng 99,1% với *Conexibacter stalactiti* YC2-25 (T). Nhiều loài thuộc chi *Mycolicibacterium* (trước đây là *Mycobacterium*) đã được báo cáo về khả năng phân giải hợp chất hữu cơ gây ô nhiễm, bao gồm cả carbazole [1]. Tuy nhiên, chưa có một công bố nào trước đây đề cập đến loài *Mycolicibacterium iranikum* có khả năng phân giải carbazole.

Trong nghiên cứu này, hai chủng *Mycolicibacterium iranikum* ER07-1 và *Conexibacter stalactiti* ER07-2 sinh trưởng cùng nhau, và không thể tách riêng từng chủng sau khi lập lại 11 lần tinh sạch trên môi trường M63-Car. Điều này củng cố thêm

kết luận từ các nghiên cứu trước đây cho rằng, phân giải carbazole là quá trình phức tạp, đòi hỏi sự tham gia của nhiều vi sinh vật, hỗ trợ lẫn nhau trong quá trình chuyển hóa [22, 23]. Hỗn hợp hai chủng ER07-1 và ER07-2 có tiềm năng được sử dụng để nâng cao hiệu quả xử lý ô nhiễm carbazole bên cạnh mẫu làm giàu ER07 bao gồm tập hợp các vi sinh vật bản địa.



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn (a) ER07-1 và (b) ER07-2 phân lập từ mẫu làm giàu ER07 phân giải carbazole.

4. KẾT LUẬN

Mẫu làm giàu ER07 có khả năng phân giải carbazole đã được làm giàu từ mẫu đất FC2-PL4 nhiễm dioxin nặng tại sân bay quân sự Biên Hòa. Mẫu làm giàu ER07 có thể phân giải 95,2% trong tổng số 200 ppm carbazole cung cấp vào môi trường sau 144 giờ nuôi cấy. Tốc độ phân giải carbazole bị chậm hơn khi môi trường được bổ sung D-glucose. Hai chủng vi khuẩn *Mycolicibacterium iranicum* ER07-1 và *Conexibacter stalactiti* ER07-2 có khả năng phân giải carbazole và sinh trưởng trên môi trường có carbazole nồng độ cao cũng được xác định. Nghiên cứu này bước đầu cung cấp những thông tin hữu ích phục vụ các nghiên cứu sâu hơn trong tương lai nhằm ứng dụng mẫu làm giàu ER07 có khả năng phân giải carbazole trong xử lý môi trường đất nhiễm carbazole nói riêng và hợp chất vòng thơm PAHs nói chung.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ trong nhiệm vụ khoa học và công nghệ Quỹ gen cấp quốc gia mã số NVQG-2021/ĐT.02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. L. B. Salam, M. O. Ilori, and O. O. J. B. Amund (2017). Properties, environmental fate and biodegradation of carbazole, 3 *Biotech.*, Vol. 7, pp. A1-A14.
- [2]. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Vol. 92, pp. A1.
- [3]. J. Guo, D. Chen, D. Potter, K. J. Rockne, N. C. Sturchio, J. P. Giesy, & A. Li (2014). Polyhalogenated carbazoles in sediments of Lake Michigan: a new discovery, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 48, pp. A12807-A12815.
- [4]. J. Guo, Z. Li, P. Ranasinghe, S. Bonina, S. Hosseini, M. B. Corcoran, C. Smalley, K. J. Rokne, N. C. Sturchio, J. P. Giesy & A. Li (2017). Spatial and temporal trends of polyhalogenated carbazoles in sediments of upper Great Lakes: insights into their origin, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 51, pp. A89-A97.
- [5]. K. Inoue, H. Habe, H. Yamane, T. Omori, H. Nojiri (2005). Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium, *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol 245, pp. A145-A153.
- [6]. N. Hideaki (2012). Structural and molecular genetic analyses of the bacterial carbazole degradation system, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 76, pp. A1-A18.
- [7]. J. W. Nam, H. Nojiri, H. Noguchi, H. Uchimura, T. Yoshida, T. Habe, H. Yamane, T. Omori (2002). Purification and characterization of carbazole 1, 9a-dioxygenase, a three-component dioxygenase system of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68, pp. A5882-A5890.

- [8]. N. Hideaki and T. Omori (2002). Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 66, pp. A2001-A2016.
- [9]. H. Nojiri, J. W. Nam, M. Kosaka, K. I. Morii, T. Takemura, K. Furihata, H. Yamane T. Omori (1999). Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1, 9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10, *J. Bacteriol.*, Vol. 181, pp. A3105-A3113.
- [10]. I. H. Nam, Y. M. Kim, Y.S. Schmidt, J. A. Chang (2006). Biotransformation of 1, 2, 3-tri- and 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas wittichii* strain RW1, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 72, pp. A112-A116.
- [11]. S. M. Resnick, & D. T. Gibson (1996). Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, pp. A4073-A4080.
- [12]. A. Martínez-Toledo, D. C. Cuevas-Díaz, M. Guzmán-López, O. López-Luna, J., & C. Ilizaliturri-Hernández (2022). Evaluation of in situ biosurfactant production by inoculum of *P. putida* and nutrient addition for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged oil-polluted soil, *Biodegradation*, Vol. 33, pp. A135-A155.
- [13]. L. Rong, X. Zheng, B. T. Oba, C. Shen, X. Wang, H. Wang, Q. Luo & L. Sun (2021). Activating soil microbial community using bacillus and rhamnolipid to remediate TPH contaminated soil, *Chemosphere*, Vol. 275, 130062.
- [14]. A. Aburto-Medina, E. M. Adetutu, S. Aleer, J. Weber, S. Patil, P. J. Sheppard, A. S. Ball & A. L. Juhasz (2012). Comparison of indigenous and exogenous microbial populations during slurry phase biodegradation of long-term hydrocarbon-contaminated soil, *Biodegradation*, Vol. 23, pp. A813-A822.
- [15]. E. J. Hilyard, J. M. Jones-Meehan, B. J. Spargo, & R. T. Hill (2008). Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 74, pp. A1176-A1182.
- [16]. C. Lu, Y. Hong, J. Liu, Y. Gao, Z. Ma, B. Yang, W. Ling & M. G. Waigi (2019). A PAH-degrading bacterial community enriched with contaminated agricultural soil and its utility for microbial bioremediation, *Environ. Pollut.*, Vol. 251, pp. A773-A782.
- [17]. Pham Thi Hue, Nguyen Quoc Dinh, Nguyen Kim Nu Thao, Nguyen Hong Minh (2022). Enrichment of a stable carbazole-degrading microbial consortium from dioxin contaminated soils at Bien Hoa airport, *Proceedings of VietNam national conference on biotechnology*, pp. A1242-A1248.
- [18]. A. Zulkharnain and J. S. Taka (2011). Preliminary studies on heterocyclic hydrocarbon degrading bacteria isolated from Southwest coast of Borneo," in Leveraging on microbial diversity for a sustainable future: proceedings of the International Congress of the Malaysian Society for Microbiology 2011 : Malaysian Society for Microbiology.
- [19]. T. H. Nguyen, H. M. Nguyen, V. H. Duong, T. H. Dinh (2009). An active PAH-degrading microbial consortium developed from dioxin-contaminated sediments via enrichment technique, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, Vol. 25, pp. A158-A164.

- [20]. H. M. Nguyen, V. H. Duong, T. H. Nguyen, and T. H. Dinh (2010). Study on PAH degrading bacteria isolated from dioxin contaminated soil in Vietnam, *VNU Journal of science, Natural sciences and Technology*, Vol. 26, pp. A27-A35,
- [21]. S. K. Kirkok, J. K. Kibet, T. K. Kinyanjui, and F. I. Okanga (2020). A review of persistent organic pollutants: Dioxins, furans, and their associated nitrogenated analogues, *SN Appl. Sci.*, Vol. 2, pp. A1-A20.
- [22]. S. Vasileiadis, C. Perruchon, B. Scheer, L. Adrian, N. Steinbach, M. Trevisan, P. Patricia-Bolanos, A. Aguera & D. G. Karpouzias (2022). Nutritional inter-dependencies and a carbazole-dioxygenase are key elements of a bacterial consortium relying on a *Sphingomonas* for the degradation of the fungicide thiabendazole, *Environ. Microbiol.*, Vol 24, pp. A5105-5122.
- [23]. T. Zhang, H. Zhang (2022). Microbial Consortia Are Needed to Degrade Soil Pollutants, *Microorganisms*, Vol. 10(2): 261.

CARBAZOLE DEGRADING OF MICROBIAL CONSORTIUM ER07 ENRICHED FROM DIOXIN-CONTAMINATED SOIL AT BIEN HOA AIRPORT

**Pham Thi Hue¹, Ngo Thi Thuy Huong², Nguyen Quoc Dinh³, Tran Huu Phong²
Nguyen Kim Nu Thao¹, Nguyen Hong Minh^{2,4*}**

¹ Faculty of Biology, Hanoi University of Science, VNU

² Department of Biotechnology, Chemistry and Environmental Engineering, Phenikaa University

³ External Engagement Office, Phenikaa University

⁴ Bioresource Research Center, Phenikaa University

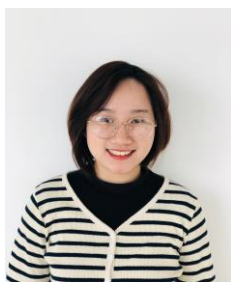
*Email: minh.nguyenhong@phenikaa-uni.edu.vn

ABSTRACT

In this study, the microbial consortium, which effectively degraded carbazole, was enriched from the dioxin-contaminated soil FC2-PL4 sample at Bien Hoa airport, Vietnam. After 7 continuous enrichments, the microbial consortium ER07 degraded 95.2% of the total carbazole at 144 h of culture. Our findings showed that the carbazole degradation capacity of ER07 in M63-Car was 3 times higher than that in the TSB complex medium. Besides, in this study, the effect of D-glucose at the concentration of 0.25; 0.5, and 5 g/L on carbazole degradation was investigated. The results indicated that the efficiency of carbazole degradation of the microbial consortium ER07 was stable and highest in the medium lacking D-glucose. The

mixture of carbazole-degrading bacteria, *Mycolicibacterium iranicum* ER07-1 và *Conexibacter stalactiti* ER07-2, was identified. Therefore, the microbial consortium ER07 plays a potential application for carbazole and carbazole-like compounds bioremediation in degraded soils.

Keywords: Dioxin-contaminated soil, Microbial consortium, Carbazole degradation, Bioremediation.



Phạm Thị Huệ sinh ngày 12/2/1997 tại Thái Bình. Bà tốt nghiệp cử nhân Sinh học tại trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội năm 2020. Bà đang là học viên cao học chuyên ngành Công nghệ sinh học tại Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội

Lĩnh vực nghiên cứu: Vi sinh vật học, Công nghệ sinh học



Ngô Thị Thúy Hương sinh ngày 15/06/1974 tại Bắc Giang. Bà tốt nghiệp Kỹ sư ngành Nuôi trồng Thủy sản, chương trình liên kết giữa AIT Thái Lan với Viện nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản 1 và trường đại học Nha Trang năm 1997, tốt nghiệp thạc sĩ Nuôi trồng thủy sản tại trường Đại học Ghent, Belgium năm 2001, nhận học vị tiến sĩ Khoa học tự nhiên năm 2008, chuyên ngành Hóa môi trường và Độc học sinh thái tại trường Đại học Bayreuth, CHLB Đức. Bà công tác tại trường Đại học Phenikaa từ năm 2020.

Lĩnh vực nghiên cứu: Sức khỏe môi trường, Độc học sinh thái và Khoa học môi trường.



Nguyễn Quốc Định sinh ngày 16/06/1970 tại Nam Hà. Ông nhận bằng Kỹ sư địa chất thăm dò của trường Đại học Mỏ và Địa chất Hà Nội, Việt Nam, năm 1992, bằng Thạc sĩ về Tài nguyên đất của Đại học Ghent và Đại học Tự do Brussels, Bỉ, năm 2001; và bằng tiến sĩ Khoa học tự nhiên, chuyên ngành Địa sinh thái từ Đại học Bayreuth, Đức, năm 2009. Ông công tác tại ĐH Phenikaa từ năm 2022.

Lĩnh vực nghiên cứu: Khoa học đất, Giảm thiểu rủi ro thiên tai, Quản lý nước và môi trường, Thích ứng và giảm nhẹ biến đổi khí hậu, Nông nghiệp thông minh với khí hậu, Mục tiêu phát triển bền vững



Trần Hữu Phong sinh ngày 10/08/1982 tại Bắc Giang. Ông nhận bằng Cử nhân sư phạm tại trường Đại học Sư phạm Hà Nội năm 2004, bằng Thạc sĩ và Tiến sĩ chuyên ngành Vi sinh vật học tại trường Đại học Sư phạm Hà Nội năm 2007 và 2016. Ông công tác tại ĐH Phenikaa từ năm 2020.

Lĩnh vực nghiên cứu: Vi sinh vật học, Công nghệ lên men.



Nguyễn Kim Nữ Thảo sinh ngày 24/12/1983 tại Hà Nội. Bà tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học tại trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội năm 2005, nhận học vị tiến sĩ năm 2012 tại trường Đại học Utah, Hoa Kỳ. Hiện nay, bà công tác tại trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Lĩnh vực nghiên cứu: Các chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật, Sinh học phân tử vi sinh vật, Vi sinh vật học ứng dụng



Nguyễn Hồng Minh sinh ngày 05/08/1985 tại Hải Dương. Bà tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học tại trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội năm 2007, tốt nghiệp thạc sĩ kỹ thuật tại trường Đại học Osaka, Nhật Bản năm 2009, nhận học vị tiến sĩ năm 2014 tại trường Đại học Osaka, Nhật Bản. Hiện nay, bà công tác tại trường Đại học Phenikaa.

Lĩnh vực nghiên cứu: Vi sinh vật ứng dụng, Hoạt chất sinh học từ vi sinh vật, kỹ thuật cải biến di truyền vi sinh vật