

Xạ khuẩn có khả năng nuôi cấy trong đất ô nhiễm dioxin, khả năng sinh laccase và tiềm năng ứng dụng trong xử lý sinh học

Đào Thị Ngọc Ánh^{1*}, Bùi Thị Khánh Ly², Trần Hương Quỳnh³, Nguyễn Thị Nguyệt², Hồ Ngọc Anh², Vi Thị Kim Chi², Phạm Ngọc Long⁴, Cung Thị Ngọc Mai², Nguyễn Phương Minh³, Lê Thị Nhi Công²

¹Khoa Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Hóa học Môi trường Quân sự, Bộ Quốc phòng, xã An Khánh, huyện Hoài Đức, Hà Nội, Việt Nam

⁴Công ty Cổ phần Hemotek, SunriseA, The Manor Central Park, Nguyễn Xiển, phường Đại Kim, quận Hoàng Mai, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 5/11/2023; ngày chuyển phản biện 9/11/2023; ngày nhận phản biện 30/11/2023; ngày chấp nhận đăng 2/12/2023

Tóm tắt:

Xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng trong hệ vi sinh vật của đất ô nhiễm chất độc hóa học, chúng là một trong những nhóm vi sinh vật chiếm ưu thế. Xạ khuẩn có khả năng phát triển, chuyển hóa và phân hủy các chất ô nhiễm hữu cơ bền vững, thuốc trừ sâu, hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) và loại màu thuốc nhuộm... Trong nghiên cứu này, phenanthrene và màu dệt nhuộm được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu nhằm xác định khả năng phân hủy và loại màu của xạ khuẩn phân lập được từ đất ô nhiễm dioxin tại Sân bay A So, tỉnh Thừa Thiên Huế. Kết quả phân tích xạ khuẩn trong mẫu ô nhiễm cho thấy, ở độ sâu 20-30 cm số lượng xạ khuẩn nhiều hơn so với ở độ sâu 150-180 cm. Trong 26 chủng xạ khuẩn được khảo sát, có 5 chủng sinh laccase với hoạt tính lớn hơn 20 U/l, trong đó cao nhất là chủng *Streptomyces* sp. XAS3 đạt 468,06 U/l. Chủng *Streptomyces* sp. XAS3 phân hủy 42,04% phenanthrene sau 3 tuần; và loại màu 16/18 loại thuốc nhuộm màu được khảo sát, hiệu quả loại màu cao nhất, đạt 26,72±0,94% với màu thuốc nhuộm nhóm anthraquinone acid blue 62 sau 20 phút phản ứng. Kết quả thu được cho thấy tiềm năng ứng dụng vào xử lý sinh học phân hủy các chất ô nhiễm của xạ khuẩn từ đất ô nhiễm tại Sân bay A So.

Từ khóa: dioxin, hydrocarbon thơm đa vòng, laccase, loại màu thuốc nhuộm, xạ khuẩn, xử lý sinh học.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.7

Culturable actinomycetes in dioxin-contaminated soil, laccase-producing ability and potential for application in bioremediation

Thi Ngọc Anh Dao^{1*}, Thi Khanh Ly Bui², Huong Quynh Tran³, Thi Nguyet Nguyen², Ngọc Anh Ho², Thi Kim Chi Vi², Ngọc Long Phạm⁴, Thi Ngọc Mai Cung², Phương Minh Nguyễn³, Thi Nhi Công Lê²

¹Faculty of Animal Science, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quỳ Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Institute of Military Environmental Chemistry, Ministry of National Defence, An Khanh Commune, Hoài Đức District, Hanoi, Vietnam

⁴Hemotek Joint Stock Company, SunriseA, The Manor Central Park, Nguyễn Xiển Street, Đại Kim Ward, Hoàng Mai District, Hanoi, Vietnam

Received 5 November 2023; revised 30 November 2023; accepted 2 December 2023

Abstract:

Actinomycetes play an important role in microbial community in contaminated soil, they are one of the dominant groups. Actinomycetes have the ability to metabolise and degrade persistent organic pollutants such as pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and decolour textile dyes... In this study, phenanthrene and textile dyes were used as subjects to determine the degradation and decolourisation ability of actinomycetes which were isolated from dioxin-contaminated soil at A So airbase, Thua Thien Hue province. The results of quantifying culturable actinomycetes in dioxin-contaminated soil showed that at a depth of 20-30 cm the number of actinomycetes was greater than at a depth of 150-180 cm. Among the 26 tested actinomycete strains, there were 5 laccase-producing strains with laccase activity greater than 20 U/l, of which the highest was *Streptomyces* sp. XAS3 reached 468.06 U/l. *Streptomyces* sp. XAS3 degraded 42.04% phenanthrene after 3 weeks of incubation; and decoloured 16 out of 18 surveyed textile dyes, the highest decolourisation efficiency reaching 26.72±0.94% with an anthraquinone dye acid blue 62 after 20 minutes of reaction. The results show the potential of the actinomycete isolated from dioxin-contaminated soil at A So airport for application in bioremediation of pollutants.

Keywords: actinomycetes, bioremediation, dioxin, laccase, polycyclic aromatic hydrocarbon, textile dye decolourisation.

Classification numbers: 1.6, 2.7

*Tác giả liên hệ: Email: daoanh0710@gmail.com; daoanh@vnua.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như chăm sóc sức khỏe, dược phẩm, xử lý môi trường..., nhóm này có khả năng sinh tổng hợp đa dạng các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học khác nhau, cùng với nhiều loại enzyme có giá trị kinh tế. Ngoài ra, xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái của đất ô nhiễm chất độc hóa học, chúng thường là một trong những nhóm chiếm ưu thế [1]. Xạ khuẩn cho thấy vai trò quan trọng trong quá trình xử lý sinh học chất ô nhiễm do chúng duy trì ưu thế trong quá trình xử lý ô nhiễm [2]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về khả năng phân hủy dioxin hay các chất ô nhiễm vòng thơm khác chủ yếu tập trung vào các chủng vi khuẩn, số lượng chủng xạ khuẩn được công bố ít hơn nhiều so với các đại diện vi khuẩn.

Trong những năm qua, đã có nhiều kết quả nghiên cứu về sự phân hủy thuốc trừ sâu bởi xạ khuẩn. *Streptomyces* và xạ khuẩn không phải *Streptomyces* thuộc các chi *Arthrobacter*, *Frankia*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Nocardioide*s và *Rhodococcus* là những loại xạ khuẩn có nhiều công bố về khả năng phân hủy thuốc trừ sâu. Những vi sinh vật này thể hiện khả năng phát triển, chuyển hóa và phân hủy một số họ thuốc trừ sâu, bao gồm hợp chất hữu cơ (chlor-pyrifos, dimethoate), organochlorine (endosulfan, lindane, pentachlorophenol, pentachloronitrobenzene, hexachlorobenzene), triazine (atrazine, simazine, terbutylazine), các hợp chất pyrethroid tổng hợp (deltameth-rin, cypermethrin) và benzimidazole (carbendazim) [3]. Các nghiên cứu cho thấy, *Terrabacter* sp. DBF63 có khả năng phân hủy các đồng loại của polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins và dibenzofurans (PCDD/Fs) là 2-CDD; 2,3- CDD; 2-CDF; 2,8-DCDF với nồng độ 10 µg/ml trong 18 giờ có thể phân hủy được 75-85%. *Rhodococcus opacus* SAO 101 được chứng minh là có thể phân hủy các hydrocarbon thơm đa vòng khác nhau như naphthalene dibenzofuran (DF) và dibenzo-*p*-dioxin (DD) [4].

Trong số các enzyme tham gia vào quá trình phân hủy các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy, enzyme laccase xạ khuẩn có tiềm năng lớn trong xử lý sinh học nhưng vẫn còn ít được tập trung nghiên cứu. Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, E.C 1.10.3.2) là một enzyme đa đồng thuộc nhóm các blue-oxidase. Laccase thuộc nhóm oxidoreductase, enzyme laccase xúc tác quá trình oxy hóa đơn điện tử của một phổ rộng các cơ chất. Quá trình oxy hóa cơ chất được kết hợp với quá trình khử 4 electron của

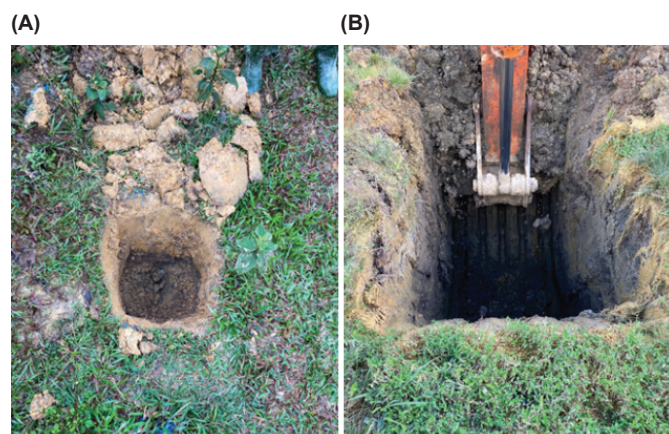
O₂ thành H₂O [5]. Enzyme laccase được biết đến với khả năng tấn công các thành phần phenolic của lignin và các chất ô nhiễm của nước thải, hydrocarbon thơm đa vòng (PAH), loại màu thuốc nhuộm gây ô nhiễm trong ngành dệt may... Do đó, enzyme này có vai trò quan trọng trong xử lý sinh học [6]. Ngoài ra, hình thái dạng sợi của xạ khuẩn tạo điều kiện cho sự xâm nhập và lan rộng trong quá trình tăng trưởng, dẫn đến sự phân hủy hiệu quả hơn. Hơn nữa, chúng còn sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào phân giải cellulose, hemi-cellulose và lignin [7].

Nhiều nghiên cứu khác nhau về các phương pháp nhằm tăng cường và tăng hiệu quả của quá trình xử lý sinh học các chất ô nhiễm, trong đó, tăng cường sinh học với xạ khuẩn là một cách tiếp cận thân thiện với môi trường. Actinobacteria đã được chứng minh là có nhiều trong đất bị ô nhiễm và có khả năng chuyển hóa các chất gây ô nhiễm để chúng phát triển. Hơn nữa, tiềm năng của xạ khuẩn trong việc phân hủy các chất ô nhiễm hữu cơ bền vững, thuốc trừ sâu, PAH và loại màu thuốc nhuộm đã được chứng minh trong một số công trình đã được công bố trước đây, cho thấy tiềm năng của chúng như một nhân tố để tăng cường sinh học phân hủy các chất ô nhiễm [6-8]. Trong nghiên cứu này, phenanthrene (một loại PAH) và màu dệt nhuộm được sử dụng làm mẫu nghiên cứu nhằm xác định khả năng phân hủy và loại màu của xạ khuẩn phân lập được từ đó đánh giá tiềm năng ứng dụng vào xử lý sinh học của chúng nghiên cứu.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và đối tượng

Vật liệu nghiên cứu là mẫu đất ô nhiễm dioxin được thu thập tại Sân bay A So, huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế. 5 mẫu được lấy ở độ sâu 20-30 cm, 5 mẫu ở độ sâu 150-180 cm (hình 1).



Hình 1. Mẫu đất ô nhiễm tại Sân bay A So, Thừa Thiên Huế. (A) Độ sâu 20-30 cm; (B) Độ sâu 150-180 cm.

Đối tượng nghiên cứu là chủng xạ khuẩn có khả năng sinh laccase và khử màu thuốc nhuộm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định số lượng xạ khuẩn từ đất ô nhiễm dioxin: Môi trường Gause có cải tiến được sử dụng để xác định số lượng và sàng lọc, nuôi cấy xạ khuẩn với các thành phần (g/l): KNO_3 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,45; KH_2PO_4 0,15; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,35; NaCl 1; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01; tinh bột 10; Agar 15 [9], bổ sung thêm 0,01% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Đếm số lượng xạ khuẩn trong đất theo phương pháp đếm số đơn vị hình thành khuẩn lạc trên môi trường Gause cải tiến, có bổ sung dung dịch được chiết từ đất ô nhiễm dioxin chứa hỗn hợp các thành phần gồm chất diệt cỏ và đồng dạng dioxin 2, 3, 7, 8-TCDD. Dịch chiết đất được sử dụng như nguồn cơ chất bổ sung dùng trong phân lập xạ khuẩn từ mẫu đất ô nhiễm dioxin. Cụ thể như sau: 10 g mẫu đất sau khi đồng nhất được bổ sung vào bình tam giác thể tích 250 ml chứa 90 ml nước muối sinh lý vô trùng, lắc 150 vòng/phút trong 15 phút tại nhiệt độ phòng. Dung dịch đất tiếp tục được pha loãng theo dãy số thập phân đến 10^{-5} . 100 μl dung dịch ở mỗi độ pha loãng được cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường Gause cải tiến đã bổ sung dịch chiết đất, mẫu sau đó nuôi tại 30°C . Sau 5-7 ngày nuôi cấy, quan sát và kiểm đếm các khuẩn lạc có đặc điểm hình thái đặc trưng của xạ khuẩn (khuẩn lạc hình dạng phóng xạ, hình vòng tròn đồng tâm; khuẩn lạc khô, rắn chắc, mép khuẩn lạc hằn sâu vào môi trường, bề mặt khuẩn lạc có lỗ...).

Xác định hoạt tính laccase: Hoạt tính laccase được xác định dựa trên sự oxy hóa 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) tạo thành hợp chất được hấp thụ ánh sáng mạnh tại bước sóng 420 nm [10]. Các chủng xạ khuẩn được nuôi trong môi trường Gause lỏng ở 30°C , lắc 200 vòng/phút. Sau mỗi 24 giờ, 1 ml dịch nuôi cấy được thu và ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C để xác định hoạt tính laccase. Một lượng dung dịch chứa enzyme được ủ với 1 mM ABTS trong đệm sodium acetate 33,4 mM, pH 3, trong thể tích phản ứng 1 ml. Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Dung dịch phản ứng được tiến hành đo ở bước sóng 420 nm tại 0 và 2 phút bằng máy quang phổ UV-Vis [11]. Một đơn vị hoạt tính laccase là lượng enzyme cần thiết để tạo thành 1 μM sản phẩm từ ABTS trong thời gian 1 phút, ở điều kiện thí nghiệm.

Xác định khả năng phân hủy phenanthrene: Phenanthrene ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) là một chất thuộc nhóm PAH có chứa 3 vòng benzen, trong nghiên cứu này phenanthrene được sử dụng như PAH mẫu nhằm xác định khả năng phân hủy bởi chủng xạ khuẩn

có hoạt tính laccase. Chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Gause cải tiến có bổ sung phenanthrene là mẫu thí nghiệm, mẫu đối chứng là môi trường có lượng tương tự phenanthrene nhưng không bổ sung chủng xạ khuẩn. Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác thể tích 250 ml chứa 50 ml môi trường nuôi cấy, các bình thí nghiệm và đối chứng được giữ ở cùng điều kiện ở 30°C , lắc ở tốc độ 150 vòng/phút trong 3 tuần. Mẫu được thu nhận sau 3 tuần để xác định dư lượng phenanthrene.

Mẫu nuôi cấy được đem chiết phân lớp với dung môi hexane theo tỷ lệ 1:1. Lắc trong 30 phút, gạn, hút pha trong phía trên, lặp lại bước chiết với hexane 3 lần. Gộp dung dịch đem cô quay thu được cao chiết. Định lượng phenanthrene trên thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (UPLC) theo phương pháp sau: Cao chiết thu được đem hoà tan với 1 ml dung môi acetonitrile; sử dụng cột phân tích ACQUITY UPLC[®] BEH C18 với các điều kiện như nhiệt độ cột 30°C ; tốc độ dòng 0,1 ml/phút; thể tích bơm mẫu: 2,0 μl ; pha động acetonitrile/nước theo tỷ lệ 7:3; thời gian chạy 40 phút và đo bằng đầu dò DAD, bước sóng 254 nm [12]. Nồng độ phenanthrene được xác định dựa vào đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ 5-1000 $\mu\text{g/ml}$. Sự khác biệt về nồng độ phenanthrene giữa mẫu thí nghiệm và đối chứng là cơ sở xác định khả năng phân hủy sinh học bởi chủng xạ khuẩn nghiên cứu. Thí nghiệm được lặp lại hai lần.

Xác định khả năng loại màu thuốc nhuộm: Các thuốc nhuộm được sử dụng để đánh giá hiệu quả loại màu bằng enzyme laccase sinh tổng hợp bởi xạ khuẩn gồm các màu với bước sóng hấp thụ cực đại như sau: acid green 27 (620 nm), nova yellow S3R (418 nm), mega fix turquoise BES (430 nm), nova yellow FN2R (430 nm), drimaren yellow CLRR (480 nm), sirius direct searlet BY (490 nm), acid red 299 (520 nm), drimaren red CL5B (540 nm), methyl orange (578 nm), megafix red EBR (540 nm), IN13 (560 nm), acid blue 113 (560 nm), terasil red FBN (592 nm), acid blue 62 (595 nm), direct black CLS (600 nm), acid blue 281 (600 nm), mega fix NAVY FBN (602 nm), nova navy SG (620 nm).

Tổng thể tích phản ứng loại màu thuốc nhuộm là 5 ml bao gồm enzyme laccase thô (hoạt tính 200 U/l), màu thuốc nhuộm (nồng độ 10 mg/l), dung dịch đệm sodium acetate 20 mM pH4. Mẫu đối chứng có chứa màu thuốc nhuộm (nồng độ 10 mg/l), dung dịch đệm sodium acetate 20 mM pH4 và enzyme thô bị biến tính nhiệt ở 100° trong 20 phút. Hiệu

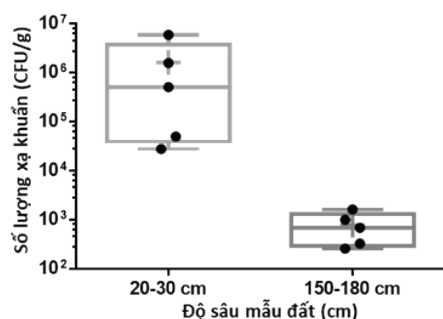
quả loại màu thuốc nhuộm được đánh giá sau 20 phút phản ứng. Độ hấp thụ màu được xác định bằng máy đo quang phổ UV-Vis 752N tại các bước sóng phù hợp với từng màu. Các thí nghiệm được lặp lại hai lần. Khả năng loại màu được xác định theo công thức: % loại màu = $\frac{(OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{thí nghiệm}})}{OD_{\text{đối chứng}}} \times 100\%$.

Phân tích số liệu: Số liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 6.01. Sự khác biệt giữa các mẫu thử được xác định thông qua t-test, F-test hoặc one-way ANOVA tùy từng thí nghiệm cụ thể. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu khi $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Khảo sát nhóm xạ khuẩn trong mẫu đất ô nhiễm dioxin tại Sân bay A So, tỉnh Thừa Thiên Huế

Mẫu đất ô nhiễm dioxin được thu thập tại 2 khoảng độ sâu khác nhau 20-30 cm (mẫu đất khô, tơi và có màu nâu vàng) và 150-180 cm (mẫu đất ướt, bết và có màu xám đen) (hình 1). Các mẫu này được đồng nhất và sử dụng để xác định số lượng xạ khuẩn tổng số có thể nuôi cấy được trên môi trường có chứa chất ô nhiễm. Kết quả phân tích đơn vị hình thành khuẩn lạc cho thấy, xạ khuẩn trong mẫu ở độ sâu 20-30 cm có số lượng lớn hơn so với mẫu ở độ sâu 150-180 cm. Số lượng trung bình của 5 mẫu ở độ sâu 20-30 cm là $1,63 \times 10^6$ CFU/g, trong khi với 5 mẫu ở độ sâu 150-180 cm là $7,84 \times 10^2$ CFU/g (hình 2). Phân tích F-test xác định số lượng xạ khuẩn ở 2 nhóm mẫu là khác nhau đáng kể về mặt thống kê với $p < 0,0001$.



Hình 2. Số lượng xạ khuẩn có thể nuôi cấy được trong mẫu đất ô nhiễm dioxin.

3.2. Khả năng sinh tổng hợp laccase của các chủng xạ khuẩn phân lập được

Các chủng xạ khuẩn phân lập được khảo sát khả năng sinh laccase trên môi trường Gause dịch, mẫu xác định hoạt tính laccase là mẫu dịch nuôi cấy được ly tâm loại bỏ sinh khối. Hoạt tính laccase của mỗi chủng được theo dõi trong 10 ngày nuôi cấy liên tiếp, kết quả nghiên cứu được thể hiện tại bảng 1. Các chủng được khảo sát cho thấy khả năng sinh tổng hợp laccase với mức độ khác nhau, tuy nhiên số lượng

chủng có hoạt tính cao trên 20 U/l có 5/26 chủng, chiếm tỷ lệ 19,2% bao gồm: XAS3, X4, X8.5, X9.1 và X10.6 (bảng 1). Chủng XAS3 cho thấy khả năng sinh hoạt tính laccase cao nhất trong bộ giống được sàng lọc, hoạt tính cao nhất đạt 468,06 U/l sau 8 ngày nuôi cấy. Chủng XAS3 được phân loại thuộc chi *Streptomyces* dựa trên trình tự mã hóa gen 16S rDNA và được đặt tên là *Streptomyces* sp. XAS3. Chủng cho hoạt tính laccase cao thứ hai là X8.5, chủng này sinh laccase cao nhất sau 9 ngày đạt 138,19 U/l. Ngày đạt hoạt tính cao nhất khác nhau giữa các chủng xạ khuẩn, tuy nhiên thường trong khoảng 7-10 ngày nuôi cấy (bảng 1).

Bảng 1. Khảo sát khả năng sinh laccase của các chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất ô nhiễm dioxin.

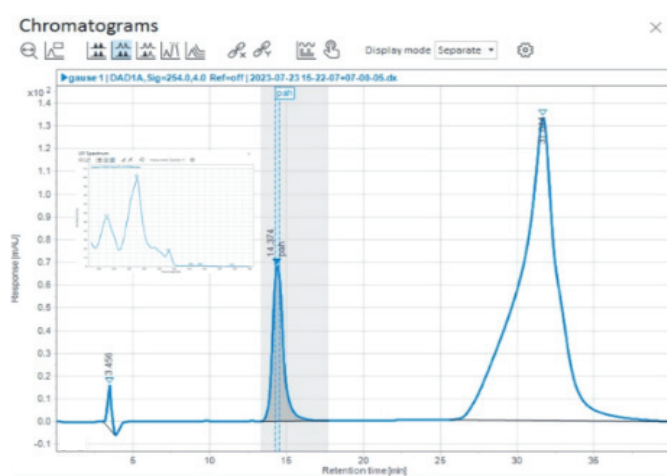
Ký hiệu chủng	Ngày thu mẫu nuôi cấy khảo sát hoạt tính laccase									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X1	1,81	2,29	2,5	1,74	1,46	2,01	2,08	2,57	3,19	2,85
X1.1	1,74	2,15	1,88	1,74	2,64	1,53	1,32	1,67	1,39	1,6
X1.2	1,6	2,15	0,9	1,39	1,11	1,04	0,9	0,83	0,63	1,04
X1.3	1,39	1,6	1,18	1,04	0,97	0,97	0,56	0,83	0,83	1,74
X1.4	0,07	0,07	1,18	0,63	0,69	0,69	1,39	1,6	0,42	0,56
X1.5	0	0,07	1,11	0,35	0,76	0,69	1,39	2,29	4,03	3,82
X2	1,25	2,01	1,6	1,67	1,32	1,74	1,6	1,74	1,46	1,74
XAS3	2,08	90,28	140,97	239,58	299,31	328,47	352,08	468,06	288,89	230,56
X4	0	0,14	35,97	56,25	34,03	50,69	78,47	77,08	84,03	93,75
X5	0,07	0,14	1,74	1,32	1,6	1,74	2,71	2,5	2,5	2,5
XV6.2	0	0,14	1,81	1,25	1,39	1,53	2,29	2,15	2,5	2,01
X7	0,07	0,14	1,88	1,67	1,67	1,88	3,19	2,57	2,36	2,08
X8.1	0	0	0,97	0,76	0,9	1,04	1,67	1,32	1,53	1,32
X8.2	0,07	0,07	1,67	1,32	1,25	1,67	2,78	2,22	2,15	1,94
X8.3	0	0,07	1,6	1,39	1,6	1,81	3,13	2,57	2,64	2,64
X8.4	0	0	1,04	0,83	0,76	0,76	0,9	0,56	0,63	0,63
X8.5	1,81	13,21	59,72	56,25	54,17	56,32	139,58	120,83	138,19	135,42
X9.1	0,07	0	12,01	12,15	12,01	12,43	25,63	24,1	26,53	17,22
X9.2	1,11	7,92	1,04	0,63	1,04	0,69	1,11	0,35	0,97	0,28
X10.1	1,145	2,33	1,705	1,285	1,565	1,945	2,185	10,035	3,54	4,585
X10.2	0,8	0,315	0,14	0,245	0,245	0,21	0	0,245	0,21	0,035
X10.3	1,425	2,535	2,12	2,775	1,945	1,84	2,19	1,6	1,98	1,285
X10.4	0	0,07	1,53	1,39	1,74	1,88	3,4	2,99	3,33	3,19
X10.5	0	0,14	2,08	1,74	1,94	2,15	3,26	2,92	3,13	2,29
X10.6	0,07	0,07	2,36	2,22	1,74	1,88	30,07	64,65	62,29	47,22
X10.7	0,59	1,18	1,945	1,91	2,255	2,155	2,71	2,19	2,33	1,98

Dữ liệu thể hiện hoạt tính laccase (U/l) dưới dạng số trung bình của hai lần đo.

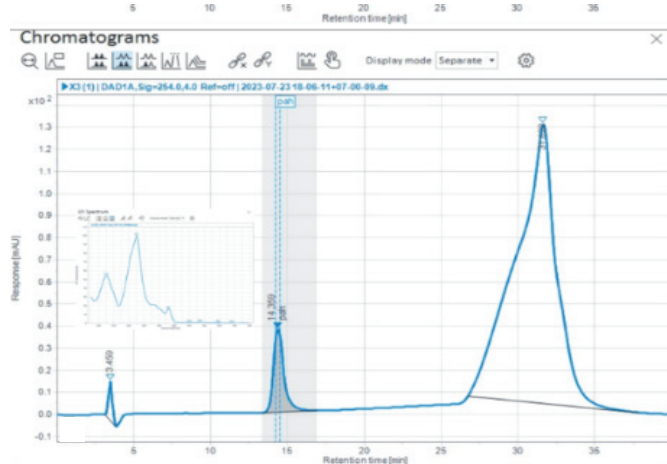
3.3. Khả năng phân hủy phenanthrene của chủng xạ khuẩn sinh laccase *Streptomyces* sp. XAS3

Phenanthrene được sử dụng như PAH mẫu cho khảo sát khả năng phân hủy sinh học bởi chủng xạ khuẩn sinh laccase *Streptomyces* sp. XAS3. Dư lượng phenanthrene trong mẫu thí nghiệm và mẫu đối chứng được phân tích bằng máy sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) và tính toán nồng độ dựa vào đường chuẩn đã được xây dựng theo phương trình sau $Y=19,8587x + 11,9106$ với $R^2=0,9999$. Phổ phân tích mẫu chiết phenanthrene từ mẫu thí nghiệm và đối chứng được thể hiện tại hình 3. Hình ảnh phổ cho thấy, dịch chiết từ hai loại mẫu chứa phenanthrene có cùng thời gian lưu và phổ UV của chất chiết và kết quả đặc trưng cho phenanthrene.

(A)

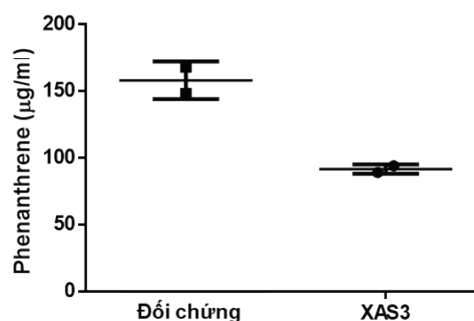


(B)



Hình 3. Phổ phân tích sắc ký lỏng siêu hiệu năng. (A) Mẫu đối chứng; **(B)** Mẫu phân hủy sinh học phenanthrene bởi *Streptomyces* sp. XAS3.

Sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung phenanthrene, XAS3 phân hủy được 42,04% phenanthrene so với mẫu đối chứng. Hàm lượng phenanthrene còn lại trong mẫu nuôi cấy với XAS3 sau 3 tuần là $91,74 \pm 3,439 \mu\text{g/ml}$, trong khi mẫu đối chứng đạt $158,3 \pm 14,06 \mu\text{g/ml}$ (hình 4).



Hình 4. Khả năng phân hủy phenanthrene của *Streptomyces* sp. XAS3. XAS3: *Streptomyces* sp. XAS3. Biểu đồ thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, $n=2$, t-test với $p<0,05$.

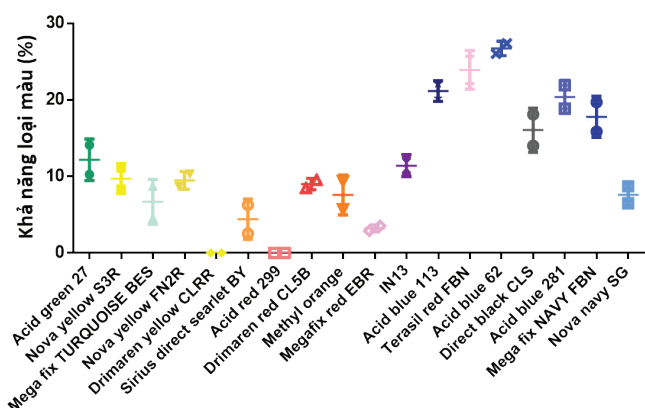
3.4. Khả năng loại màu thuốc nhuộm của laccase thô sinh tổng hợp bởi *Streptomyces* sp. XAS3

Khảo sát khả năng loại màu thuốc nhuộm màu được sử dụng trong ngành dệt may sử dụng dịch lên men có hoạt tính laccase (laccase thô) của chủng *Streptomyces* sp. XAS3 được tiến hành với 18 loại thuốc nhuộm khác nhau. Sự khác biệt màu sắc so với mẫu đối chứng sau 20 phút phản ứng được thể hiện tại hình 5. Bằng mắt thường có thể quan sát sự thay đổi màu của một số thuốc nhuộm, đáng chú ý là nhóm màu xanh có xu hướng được loại màu nhanh hơn so với nhóm màu vàng và đỏ.



Hình 5. Sự thay đổi màu của các thuốc nhuộm sau 20 phút phản ứng với dịch laccase thô của *Streptomyces* sp. XAS3. (A) Mẫu thí nghiệm; **(B)** Mẫu đối chứng.

Hiệu quả loại màu được xác định thông qua phần trăm lượng màu loại bỏ so với đối chứng, mỗi màu được xác định tại bước sóng đặc trưng riêng. Sau 20 phút loại màu, 16/18 loại thuốc nhuộm thử nghiệm được loại màu với hiệu suất khác nhau, kết quả thể hiện tại hình 6 với giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, phân tích one-way ANOVA với $p<0,0001$. Trong đó, acid blue 62 cho thấy hiệu quả loại màu cao nhất, đạt $26,72 \pm 0,94\%$. Có tổng số 6/18 thuốc nhuộm bị loại bỏ trên 15% màu bởi laccase thô của XAS3 bao gồm acid blue 113, terasil red FBN, direct black CLS, acid blue 281, mega fix NAVY FBN và acid blue 62 (hình 6). Trong khi đó, các màu như: drimaren yellow CLRR, acid red 299 hoàn toàn không bị loại màu sau 20 phút ở điều kiện pH 4, nhiệt độ phòng và xúc tác phản ứng với laccase 200 U/l.



Hình 6. Khả năng loại màu của laccase sinh tổng hợp bởi *Streptomyces* sp. XAS3.

4. Bàn luận

Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp đa dạng các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học cùng với nhiều loại enzyme có giá trị. Đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại Việt Nam là nguồn vi sinh vật đặc thù với nhiều tiềm năng ứng dụng trong xử lý sinh học môi trường, mặc dù vậy, nhóm xạ khuẩn chưa được tập trung khai thác. Trong nghiên cứu này, nhận thấy sự khác biệt số lượng xạ khuẩn có thể nuôi cấy được ở các tầng đất với độ sâu khác nhau, cùng với việc xác định được số lượng đáng kể ở độ sâu 1,8 m trong điều kiện đất ngập nước tại Sân bay A So, cho thấy tiềm năng ứng dụng nhóm xạ khuẩn trong xử lý sinh học theo phương pháp chôn lấp tích cực khi điều kiện trong hồ chôn lấp phù hợp cho sự tồn tại, sinh trưởng và phát triển của nhóm vi sinh vật này. Tuy nhiên, cần nhiều nghiên cứu cụ thể hơn và sử dụng những công cụ nghiên cứu hiện đại, cập nhật hơn (ví dụ như phân tích chỉ thị phân tử 16S rRNA amplicon) để đánh giá mức độ đa dạng của nhóm vi sinh vật này trong đất ô nhiễm dioxin đặc thù.

Có một vài công bố trước đây liên quan đến xạ khuẩn phân lập từ đất ô nhiễm dioxin và khả năng sinh laccase của chúng [13, 14], các chủng này có nguồn gốc từ đất ô nhiễm tại Sân bay Biên Hòa, tỉnh Đồng Nai. Với nguồn đất ô nhiễm tại Sân bay A So, tỉnh Thừa Thiên Huế như trong nghiên cứu này cũng cho thấy sự có mặt của các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh laccase. Tuy nhiên, tỷ lệ các chủng có hoạt tính cao trên tổng số chủng phân lập được thấp, chỉ 2 chủng cho hoạt tính trên 100 U/l trong bộ giống phân lập được. Các chủng còn lại vẫn xác định được laccase, tuy nhiên hoạt tính không cao. Mặc dù vậy, khả năng sinh laccase của các chủng trong nghiên cứu này cao hơn một số

chủng cũng được phân lập từ đất ô nhiễm đã được công bố trước đây, ví dụ như xạ khuẩn từ đất ô nhiễm dioxin tại Sân bay Biên Hòa với hoạt tính laccase khi sàng lọc dao động 0,38-0,8 U/l [13]. Điều này cho thấy khả năng sinh laccase bởi xạ khuẩn là đặc điểm khá phổ biến, tuy nhiên hiệu suất sinh laccase tùy thuộc vào đặc tính từng chủng cụ thể.

Một số chủng xạ khuẩn cho thấy vai trò quan trọng trong phân hủy các chất ô nhiễm, các công bố đã chứng minh khả năng phân hủy dioxin và các chất ô nhiễm khác của xạ khuẩn như ứng dụng chủng *Rhodococcus opacus* vào quá trình tăng cường sinh học để loại bỏ dioxin [15]. Trong nghiên cứu về các gen chức năng tham gia quá trình loại bỏ khử clo của vi khuẩn phân hủy các hợp chất vòng thơm, đã nhận thấy một số chủng xạ khuẩn phân lập được trong một mô hình vi sinh vật bán kỵ khí đều có thể sử dụng naphthalene làm nguồn năng lượng và carbon duy nhất [16]. Trong nhóm xạ khuẩn thì chi *Streptomyces* là chi có nhiều đại diện đã được chứng minh khả năng phân hủy các chất PAH cũng như các chất ô nhiễm khác [6]. Chủng XAS3 thuộc chi *Streptomyces* cũng cho thấy khả năng phân hủy PAH với hơn 42% phenanthrene bị loại bỏ, thời gian phân hủy phenanthrene của XAS3 khá dài, tuy nhiên kết quả được trình bày là kết quả sàng lọc ban đầu, thu được trong điều kiện chưa tối ưu.

Laccase từ xạ khuẩn có các đặc điểm nổi trội so với các nguồn khác như khả năng chịu nhiệt, chịu dung môi, độ bền cao [6]. Các nghiên cứu về đặc tính laccase từ xạ khuẩn còn ít, đánh giá tổng quan sâu về laccase của xạ khuẩn hiện tại còn giới hạn, các nghiên cứu chính chủ yếu tập trung vào chi *Streptomyces*. Chi này có nhiều chủng được công bố với khả năng loại màu, cả màu nhóm azo và anthraquinone [17]. Quá trình loại màu bởi xạ khuẩn thông qua hai con đường chính là hấp phụ trên sinh khối và chuyển hóa sinh học. Màu bị loại bỏ có thể do một số enzyme khác nhau như: laccase, manganese peroxidase (MnP) hay azoreductase... [18], trong đó laccase và MnP là các enzyme ngoại bào. Nghiên cứu thực hiện với dịch lên men đã loại bỏ sinh khối của chủng XAS3 cho thấy, chỉ có mặt của laccase mà không có MnP, do đó khả năng loại màu bởi dịch lên men XAS3 được cho là xúc tác loại màu bởi laccase có trong dịch lên men. Kết quả sàng lọc cho thấy, laccase sinh tổng hợp bởi XAS3 có khả năng loại bỏ cả màu azo và anthraquinone. Mặc dù hiệu quả loại màu cao nhất nhận thấy ở acid blue 62, màu thuộc nhóm anthraquinone, nghiên cứu không xác định được quy luật hay xu hướng trong hiệu quả loại màu của laccase XAS3 theo cấu trúc của thuốc nhuộm màu. Để

tìm ra xu hướng cũng như nâng cao hiệu quả loại màu, sàng lọc với nhiều loại thuốc nhuộm màu hơn và bổ sung thêm các chất trung gian cho laccase là các hướng nghiên cứu tiếp tục được triển khai.

5. Kết luận

Xạ khuẩn có mặt trong đất ô nhiễm dioxin tại Sân bay A So, tỉnh Thừa Thiên Huế với số lượng không giống nhau ở các tầng đất với độ sâu khác nhau. Các chủng xạ khuẩn có nguồn gốc từ đất ô nhiễm được khảo sát có khả năng sinh laccase, hoạt tính cao nhất đạt được sau 7-10 ngày nuôi cấy. Chủng chọn lọc *Streptomyces* sp. XAS3 sinh laccase cao có khả năng phân hủy phenanthrene và dịch laccase thô thu được có khả năng loại màu thuốc nhuộm thuộc cả nhóm azo và anthraquinone.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Tran, H. Nguyen, T. Nguyen, et al. (2022), "Microbial communities along 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzodioxin concentration gradient in soils polluted with agent orange based on metagenomic analyses", *Microb. Ecol.*, **85**, pp.197-208, DOI: 10.1007/s00248-021-01953-y.
- [2] S. Saibu, S.A. Adebuseye, G.O. Oyetibo (2023), "Soil microbiome response to 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin during bioremediation of contaminated tropical soil in a microcosm-based study", *J. Hazard. Mater.*, **451**, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.131105.
- [3] C.I. Mawang, A.S. Azman, A.S.M. Fuad, et al. (2021), "Actinobacteria: An eco-friendly and promising technology for the bioaugmentation of contaminants", *Biotechnol. Rep.*, **32**, DOI: 10.1016/j.btre.2021.e00679.
- [4] H. Habe, K. Ide, M. Yotsumoto, et al. (2002), "Degradation characteristics of a dibenzofuran-degrader *Terrabacter* sp. strain DBF63 toward chlorinated dioxins in soil", *Chemosphere*, **48**(2), pp.201-207, DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00064-4.
- [5] L. Karthik (2022), *Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology*, Springer Singapore, DOI: 10.1007/978-981-16-5835-8.
- [6] L. Arregui, M. Ayala, X.G. Gil, et al. (2019), "Laccases: Structure, function, and potential application in water bioremediation", *Microb. Cell Fact.*, **18**(1), pp.1-33, DOI: 10.1186/s12934-019-1248-0.
- [7] L. Limaye, R. Patil, P. Ranadive, et al. (2017), "Application of potent actinomycete strains for bio-degradation of domestic agro-waste by composting and treatment of pulp-paper mill effluent", *Adv. Microbiol.*, **7**(1), pp.94-108, DOI: 10.4236/aim.2017.71008.
- [8] T. Alves, R. Fernandes, W. Batista, et al. (2014), "Laccases from actinobacteria - What we have and what to expect", *Advances in Microbiology*, **4**(6), pp.285-296, DOI: 10.4236/aim.2014.46035
- [9] G.F. Gause, T.P. Preobrazhenskaya, M.A. Sveshnikova (1983), "A guide for the determination of actinomycetes - Genera *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, and *Chainia*", *Nauk. Moscow.*, **22**, pp.52-71.
- [10] F. Sheikhi, M.R. Ardakani, N. Enayatizamir, et al. (2012), "The determination of assay for laccase of *Bacillus subtilis* WPI with two classes of chemical compounds as substrates", *Indian J. Microbiol.*, **52**(4), pp.701-707, DOI: 10.1007/s12088-012-0298-3.
- [11] M. Gunne, V.B. Urlacher (2012), "Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with unusual properties discovered by genome mining", *PLOS ONE*, **7**(12), pp.1-8, DOI: 10.1371/journal.pone.0052360.
- [12] G.M. Titato, F.M. Lanças (2006), "Optimization and validation of HPLC-UV-DAD and HPLC-APCI-MS methodologies for the determination of selected PAHs in water samples", *J. Chromatogr. Sci.*, **44**(1), pp.35-40, DOI: 10.1093/chromsci/44.1.35.
- [13] N.Q. Huy, N.B. Huu, N.T.T. Ngan, et al. (2012), "Producing extracellular enzymes peroxidase, laccase and degrading aromatic compounds by actinomycete strain XKBH1", *Vietnam J. Sci. Technol.*, **50**(3) (in Vietnamese).
- [14] N. Kimura, Y. Urushigawa (2001), "Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin and chlorinated dibenzo-*p*-dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101", *J. Biosci. Bioeng.*, **92**(2), pp.138-143, DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80214-0.
- [15] S. Kaiya, S. Utsunomiya, S. Suzuki, et al. (2012), "Isolation and functional gene analyses of aromatic-hydrocarbon-degrading bacteria from a polychlorinated-dioxin-dechlorinating process", *Microbes Environ.*, **27**(2), pp.127-135, DOI: 10.1264/jsme2.ME11283.
- [16] C. Sun, J. Xiao, L. Bai, et al. (2023), "Defined and natural PAH contaminations shift PAH-degrading bacterial community in rhizosphere of ornamental plant species *Echinacea purpurea* L.", *Environ. Technol. Innov.*, **31**, DOI: 10.1016/j.eti.2023.103189.
- [17] B. Chakravarthi, V. Mathkala, U.M.D. Palempalli (2021), "Degradation and detoxification of Congo red azo dye by immobilized laccase of *Streptomyces sviveus*", *J. Pure Appl. Microbiol.*, **15**(2), pp.864-876, DOI: 10.22207/JPAM.15.2.41.
- [18] N.H. Adenan, Y.Y. Lim, A.S.Y. Ting (2022), "Removal of triphenylmethane dyes by *Streptomyces bacillaris*: A study on decolorization, enzymatic reactions and toxicity of treated dye solutions", *J. Environ. Manage.*, **318**, DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.115520.