

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Vũ Hà Phương

NGHIÊN CỨU KHAI THÁC DỮ LIỆU HỆ GEN (GENOME-
MINING) CỦA VI KHUẨN PHÂN GIẢI DDT VÀ LINDANE
NHẪM PHÁT TRIỂN CHẾ PHẨM ĐA CHỨC NĂNG ỨNG DỤNG
XỬ LÝ ĐẤT Ô NHIỄM Ở VIỆT NAM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2026

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Vũ Hà Phương

NGHIÊN CỨU KHAI THÁC DỮ LIỆU HỆ GEN (GENOME-MINING) CỦA VI KHUẨN PHÂN GIẢI DDT VÀ LINDANE
NHẪM PHÁT TRIỂN CHẾ PHẨM ĐA CHỨC ỨNG DỤNG
XỬ LÝ ĐẤT Ô NHIỄM Ở VIỆT NAM

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9420107

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS.TS. Phạm Thế Hải

Chủ tịch Hội đồng

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Phạm Thế Hải. Các số liệu, kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí uy tín, phần còn lại chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày 30 tháng 07 năm 2026

Vũ Hà Phương

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới **PGS. TS. Phạm Thế Hải** – Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, người đã tận tình định hướng, giúp đỡ và chỉ bảo tôi từ khi tôi còn là sinh viên đại học. Chính thầy là người đã truyền cho tôi niềm đam mê khoa học, khích lệ tôi tiếp tục theo đuổi con đường nghiên cứu, từ đó giúp tôi có thêm niềm tin và động lực để học tập và hoàn thành luận án này. Thầy không chỉ tận tâm hướng dẫn, góp phần định hình nội dung và phương pháp nghiên cứu của luận án, mà còn trang bị cho tôi những kiến thức và kỹ năng quan trọng để từng bước trở thành một nhà khoa học.

Tôi cũng chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các thầy cô, anh chị cùng các bạn thuộc phòng thí nghiệm GREENLAB, Trung tâm nghiên cứu Khoa học Sự sống (CELIFE), Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN đã luôn sẵn sàng hỗ trợ, chia sẻ kinh nghiệm, động viên và đồng hành cùng tôi trong công việc cũng như trong cuộc sống.

Tôi cũng xin gửi lời tri ân đến tập thể thầy cô Khoa Sinh học, đặc biệt là Bộ môn Vi sinh vật học, đã dành cho tôi sự quan tâm, giảng dạy và tạo những điều kiện tốt nhất về cả môi trường học thuật lẫn cơ sở vật chất trong suốt quá trình tôi học tập tại đây.

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ Đề tài “Khai thác và phát triển nguồn gen vi khuẩn (*Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, *Stenotrophomonas* sp., *Sphingomonas* sp. và *Streptomyces* sp.) phân hủy hiệu quả các hóa chất bảo vệ thực vật DDT và Lindane tồn dư trong đất để phục vụ nông nghiệp an toàn” (mã số NVQG-2021/ĐT.02) thuộc Chương trình Quỹ Gen của Bộ Khoa học & Công nghệ. Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Trần Thị Thanh Huyền, chủ nhiệm đề tài, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để nghiên cứu sinh được tham gia thực hiện đề tài và cho phép sử dụng các kết quả của đề tài làm cơ sở cho việc thực hiện và hoàn thiện luận án. Tôi cũng đặc biệt trân trọng và biết ơn sự hỗ trợ tài chính từ Tập đoàn

Vingroup thông qua chương trình học bổng của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (mã số VINIF.2023.TS.090). Sự đồng hành của Quỹ đã giúp tôi an tâm tập trung hoàn toàn cho công tác nghiên cứu.

Sau cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình và những người thân yêu – những người luôn là điểm tựa vững chắc, dành cho tôi sự yêu thương, động viên, tin tưởng và hỗ trợ cả về tinh thần lẫn điều kiện để tôi có thể yên tâm học tập và nghiên cứu trong suốt những năm qua.

Hà Nội, ngày 30 tháng 07 năm 2026

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	
LỜI CẢM ƠN	
DANH MỤC HÌNH	4
DANH MỤC BẢNG	8
DANH MỤC VIẾT TẮT	9
MỞ ĐẦU	11
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	15
1.1 Tổng quan chung về thực trạng ô nhiễm và tồn dư DDT và Lindane	15
1.1.1 Giới thiệu về DDT	15
1.1.2 Giới thiệu về Lindane	16
1.2 Hiện trạng và tác hại của DDT và Lindane đến con người và môi trường	17
1.3 Các phương pháp xử lý ô nhiễm, tồn dư DDT và Lindane	20
1.3.1 Tình hình chung trên thế giới	20
1.3.2 Tình hình tại Việt Nam	23
1.4 Vi sinh vật phân giải DDT và Lindane	23
1.4.1 Phân giải sinh học DDT nhờ vi sinh vật	24
1.4.2 Phân giải sinh học Lindane nhờ vi sinh vật	26
1.4.3 Các nghiên cứu về sử dụng tổ hợp chủng phân giải DDT và Lindane	29
1.5 Genome-mining và ứng dụng trong nghiên cứu vi sinh vật – xử lý ô nhiễm môi trường	30
1.6 Các yếu tố thực tế ảnh hưởng đến các tổ hợp vi sinh vật có khả năng phân giải DDT và Lindane	32
1.7 Chế phẩm sinh học xử lý ô nhiễm DDT và Lindane trong đất	35

1.7.1	Chế phẩm sinh học phân hủy thuốc BVTV	35
1.7.2	Tình hình nghiên cứu chế phẩm xử lý tồn dư DDT và Lindane	36
1.7.3	Sản xuất chế phẩm sinh học	37
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP		42
2.1	Vật liệu nghiên cứu.....	42
2.1.1	Thiết bị, dụng cụ, hóa chất	42
2.1.2	Môi trường.....	43
2.1.3	Đối tượng nghiên cứu.....	44
2.2	Sơ đồ nghiên cứu	46
2.3	Phương pháp nghiên cứu	49
2.3.1	Phương pháp phân tích hệ gen và xây dựng tổ hợp vi sinh vật	49
2.3.2	Phương pháp đánh giá hiệu quả phân giải của các tổ hợp vi sinh vật	51
2.3.3	Phương pháp xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm đa chủng.....	55
2.3.4	Xây dựng quy trình xử lý đất ô nhiễm DDT và Lindane bằng chế phẩm sinh học và bước đầu thử nghiệm trên mô hình thực tế.....	59
2.3.5	Phân tích hóa học nhằm đánh giá khả năng phân giải DDT và Lindane	64
2.3.6	Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật	66
2.3.7	Phương pháp lấy mẫu đất ngoài thực tế.....	66
2.3.8	Phân tích và xử lý số liệu	67
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....		68
3.1	Phân tích hệ gen để xây dựng tổ hợp chủng giúp phân giải hiệu quả DDT và Lindane.....	68
3.1.1	Kết quả WGS của các đơn chủng vi sinh vật.....	68

3.1.2 Chọn tạo tổ hợp chủng thông qua dự đoán tương tác dựa trên phân tích genome	82
3.1.3 Nghiên cứu đánh giá hiệu quả phân giải DDT và Lindane của các tổ hợp chủng và đánh giá các đặc tính liên quan đến khả năng ứng dụng thực tế.....	90
3.2 Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm đa chủng	105
3.2.1 Nghiên cứu quy trình lên men quy mô 10L tạo chế phẩm với các chủng phân giải DDT và Lindane.....	106
3.2.2 Nghiên cứu quy trình thu hồi sinh khối sau lên men	111
3.2.3 Nghiên cứu chất mang phù hợp để bảo quản sinh khối	113
3.2.4 Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dạng tổ hợp chủng từ các đơn chủng	119
3.3 Nghiên cứu xây dựng quy trình xử lý đất ô nhiễm DDT và Lindane bằng chế phẩm sinh học và bước đầu thử nghiệm trên mô hình thực tế.....	121
3.3.1 Thử nghiệm xử lý ô nhiễm đất DDT ở quy mô phòng thí nghiệm	121
3.3.2 Giả thuyết về con đường phân giải DDT bằng chế phẩm sinh học	129
3.3.3 Thử nghiệm xử lý ô nhiễm đất Lindane ở quy mô phòng thí nghiệm	132
3.3.4 Giả thuyết về con đường phân giải Lindane bằng chế phẩm sinh học	140
3.3.5 Bước đầu thử nghiệm đất nhiễm DDT/Lindane trên mô hình thực tế	143
3.4 Thảo luận chung	150
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	153
DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	155
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	156
PHỤ LỤC.....	i

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của DDT và các chất chuyển hóa phổ biến [43]	16
Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của Lindane và các đồng phân [43]	17
Hình 1.3. Các con đường chuyển hóa phân hủy sinh học DDT [73]	25
Hình 1.4. Các con đường phân hủy hiếu khí Lindane [132]	26
Hình 1.5. Các con đường phân hủy kỵ khí Lindane [132]	28
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu	47
Hình 2.2. Bố trí mô hình xử lý đất ô nhiễm DDT	61
Hình 2.3. Bố trí mô hình xử lý đất ô nhiễm Lindane	63
Hình 3.1. Bản đồ heatmap so sánh độ phong phú tương đối trong số lượng enzyme ở một số con đường trao đổi chất ở các đơn chủng phân giải DDT trong nghiên cứu.	77
Hình 3.2. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của một số đơn chủng phân giải DDT trong nghiên cứu.	78
Hình 3.3. Bản đồ heatmap so sánh độ phong phú tương đối trong số lượng enzyme ở một số con đường trao đổi chất ở các đơn chủng phân giải Lindane trong nghiên cứu.	79
Hình 3.4. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của một số đơn chủng phân giải Lindane trong nghiên cứu.	81
Hình 3.5. Chú thích những gen và enzyme tương ứng của những chủng nghiên cứu có tham gia vào hai con đường “Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation” và “Dioxin degradation” theo dữ liệu KEGG	82
Hình 3.6. Bản đồ tổng hợp các con đường trao đổi chất của DDT21 và TN030	83
Hình 3.7. Bản đồ chuyển hóa khi kết hợp các đơn chủng phân giải DDT thành các tổ hợp khác nhau	85
Hình 3.8. Bản đồ tổng hợp các con đường trao đổi chất của A119 và T069	87
Hình 3.9. Bản đồ chuyển hóa khi kết hợp các đơn chủng phân giải Lindane thành các tổ hợp khác nhau	89

Hình 3.10. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải DDT giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường lỏng.....	91
Hình 3.11. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải DDT giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường bán rắn	91
Hình 3.12. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải DDT giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường rắn.....	92
Hình 3.13. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến hoạt động loại chloride của các chủng vi sinh vật phân hủy DDT được xây dựng	95
Hình 3.14. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải Lindane giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường lỏng.....	98
Hình 3.15. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải Lindane giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường bán rắn.....	99
Hình 3.16. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải Lindane giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường rắn.....	100
Hình 3.17. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến hoạt động loại chloride của các chủng vi sinh vật phân hủy Lindane được xây dựng	103
Hình 3.18. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn cacbon (đề lên men sản xuất sinh khối quy mô lớn) đến khả năng sinh trưởng các chủng phân giải DDT	106
Hình 3.19. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn cacbon (đề lên men sản xuất sinh khối quy mô lớn) đến khả năng sinh trưởng các chủng phân giải Lindane	107
Hình 3.20. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ (đề lên men sản xuất sinh khối quy mô lớn) đến khả năng sinh trưởng các chủng phân giải DDT	108
Hình 3.21. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ (đề lên men sản xuất sinh khối quy mô lớn) đến khả năng sinh trưởng các chủng phân giải Lindane	109
Hình 3.22. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống khác nhau đến khả năng tạo sinh khối khi lên men các chủng phân giải DDT	110
Hình 3.23. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống khác nhau đến khả năng tạo sinh khối khi lên men các chủng phân giải Lindane.....	110

Hình 3.24. Hiệu suất thu hồi sinh khối các chủng sử dụng cho các phương án chế phẩm	112
Hình 3.25. Kết quả khảo sát mật độ của các chủng vi sinh vật thử nghiệm theo thời gian khi được phối trộn với các loại chất mang khác nhau.....	114
Hình 3.26. Kết quả khảo sát khả năng loại chloride của các chủng vi sinh vật thử nghiệm theo thời gian khi được phối trộn với các loại chất mang khác nhau	116
Hình 3.27. (A) Khả năng sống sót và (B) hoạt tính loại chloride của các chủng vi sinh vật thử nghiệm theo thời gian	118
Hình 3.28. Sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm	120
Hình 3.29. Khả năng xử lý DDT trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung nước theo các tỷ lệ khác nhau	122
Hình 3.30. Khả năng xử lý DDT trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung tỷ lệ chế phẩm khác nhau.....	124
Hình 3.31. Khả năng xử lý DDT trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung chất hoạt động bề mặt theo các	125
Hình 3.32. So sánh hiệu quả phân giải DDT trong đất của các chế phẩm trong thí nghiệm áp dụng các điều kiện phù hợp nhất (bổ sung 5% chế phẩm + 70% nước + Tween 80 0,1%)	127
Hình 3.33. Sơ đồ quy trình ứng dụng chế phẩm sinh học trong xử lý đất ô nhiễm DDT	128
Hình 3.34. Sắc ký đồ GC-MS thể hiện sản phẩm chuyển hóa của DDT trong đất bởi chế phẩm HD4 theo thời gian	129
Hình 3.35. Giả thuyết về quá trình phân hủy sinh học DDT trong đất bởi chế phẩm HD4	131
Hình 3.36. Khả năng xử lý Lindane trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm nước theo các tỷ lệ khác nhau.....	133
Hình 3.37. Khả năng xử lý Lindane trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung tỷ lệ chế phẩm theo các tỷ lệ khác nhau.....	135

Hình 3.38. Khả năng xử lý Lindane trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung chất hoạt động bề mặt theo các tỷ lệ khác nhau.	136
Hình 3.39. So sánh hiệu quả phân giải Lindane trong đất của các chế phẩm trong thí nghiệm áp dụng các điều kiện phù hợp nhất (bổ sung 1% chế phẩm + 70% nước + Tween 80 0,1%)	138
Hình 3.40. Sơ đồ quy trình ứng dụng chế phẩm sinh học trong xử lý đất ô nhiễm Lindane	139
Hình 3.41. Sắc ký đồ GC-MS thể hiện sản phẩm chuyển hóa của Lindane trong đất bởi chế phẩm HH1 theo thời gian	140
Hình 3.42. Giả thuyết về quá trình phân hủy sinh học Lindane trong đất bởi chế phẩm HH1	141
Hình 3.43. Hàm lượng DDT còn lại trong đất theo thời gian	143
Hình 3.44. Bản đồ chuyển hóa các chủng của tổ hợp HD4	145
Hình 3.45. Hàm lượng Lindane còn lại trong đất theo thời gian	147
Hình 3.46. Bản đồ chuyển hóa các chủng của tổ hợp HH1	148

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Các loại môi trường và thành phần sử dụng trong nghiên cứu	44
Bảng 2.2. Danh sách các chủng được sử dụng trong nghiên cứu	45
Bảng 3.1. Thống kê hệ gen lắp ráp sau khi lọc các mẫu	69
Bảng 3.2. Kết quả dự đoán và độ toàn vẹn của hệ gen của các mẫu	70
Bảng 3.3. Kết quả dự đoán và phân loại chức năng protein theo nhóm COG các chủng có khả năng phân giải DDT	72
Bảng 3.4. Kết quả dự đoán và phân loại chức năng protein theo nhóm COG các chủng có khả năng phân giải Lindane.....	74
Bảng 3.5. Công thức các tổ hợp phân giải DDT tiềm năng được đề xuất dựa trên tương tác giữa các đơn chủng	86
Bảng 3.6. Công thức các tổ hợp phân giải Lindane tiềm năng được đề xuất dựa trên tương tác giữa các đơn chủng	90

DANH MỤC VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
BVTV		Bảo vệ thực vật
CB	Chlorobenzene	
CSDL		Cơ sở dữ liệu
DDD	1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane	
DDE	1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene	
DDMU	1-chloro-2,2-bis-(4'-chlorophenyl)ethylene	
DDT	1,1,1-dichlorodiphenyltrichloroethane	
DGDG	Digalactosyl Diglyceride	
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Axit Deoxyribonucleic (ADN)
DPB	4,4'-dichlorobenzophenone	
GC-FID	Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)	Sắc ký khí - Đầu dò ion hóa ngọn lửa
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectroscopy	Sắc ký khí - Quang phổ khối
HCH	Hexachlorocyclohexane	
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	
L		Lít

LB	Luria Bertani	Môi trường Luria Bertani
MSM	Mineral Salt Medium	Môi trường muối khoáng tối thiểu
OD	Optical Density	Mật độ quang học
PCCH	Pentachlorocyclohexane	
POP	Persistent Organic Pollutants	Chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy
Ppm	Part Per Million	Một phần triệu
RLs	Rhamnolipids	
TCCH	Tetrachlorocyclohexene	
Tw80	Tween 80	
v/p		Vòng/phút
v/v	volume/volume	Tỷ lệ thể tích/thể tích
w/w	weight/weight	Tỷ lệ khối lượng/khối lượng
WGS	Whole Genome Sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
YS	Yeast Extract - Starch	Môi trường cao nấm men - tinh bột

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Việt Nam là một đất nước có truyền thống nông nghiệp từ xưa đến nay, và do đó nông nghiệp là ngành đóng góp tích cực cho phát triển kinh tế, xã hội của đất nước. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển mạnh của nông nghiệp là sự lạm dụng và sử dụng phổ biến thuốc hóa học trừ sâu bệnh. Đặc biệt, do sự hạn chế về hiểu biết của người dân và công tác quản lý còn lỏng lẻo nên một lượng lớn hóa chất bảo vệ thực vật đã được sử dụng tràn lan trong một thời gian dài và phát tán ra môi trường; gây ra ô nhiễm. Trong đó, đáng chú ý là hai chất khó phân hủy là DDT (Dichloro-Trichloroethane Diphenyl) và Lindane ($C_6H_6Cl_6$) hay còn được gọi là γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH).

DDT và Lindane là hai hóa chất diệt côn trùng được sử dụng phổ biến nhất và cũng là tác nhân gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. DDT và Lindane được phân loại là chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy vì tính ổn định cao trong môi trường, khiến chúng trở thành nguồn ô nhiễm lâu dài cho hệ sinh thái. Ngoài ra, DDT và Lindane còn có thể được hấp thụ dễ dàng và tích tụ trong cơ thể của các sinh vật sống; nồng độ các chất này trở nên cao hơn ở các bậc cao hơn của chuỗi thức ăn, đặc biệt là trong các loài sinh vật lớn và sống lâu. Ngoài tác dụng gây độc trực tiếp, các thuốc trừ sâu kể trên có thể còn bị biến đổi thành một hoặc nhiều chất chuyển hóa mà các chất này có thể có tính chất hóa học và độc tính khác với hợp chất ban đầu.

Ở Việt Nam, thực trạng tồn dư các hóa chất DDT và Lindane vẫn còn rất nghiêm trọng trong đất nông nghiệp. Trước thực trạng ô nhiễm nêu trên cần có những phương pháp hữu hiệu để phân giải DDT và Lindane còn tồn dư. Các cách tiếp cận khác nhau đã được sử dụng để phân giải DDT và Lindane, đó là xử lý hóa học, đốt và chôn lấp. Tuy nhiên, các phương pháp này mặc dù xử lý nhanh và hiệu quả chất ô nhiễm nhưng chi phí xử lý cao, không xử lý được triệt để, vẫn để lại một số ảnh hưởng độc hại với môi trường và sức khỏe con người. Do vậy, việc xử lý ô nhiễm bằng các phương pháp xử lý sinh học an toàn với môi trường đang dần trở thành những giải pháp được mong muốn nhất.

Xử lý các chất ô nhiễm bằng phương pháp phân hủy sinh học hiện nay đang được xem là một hướng đi mới bền vững và nhiều triển vọng trong việc giải quyết các vấn đề ô nhiễm

trong đó có ô nhiễm DDT và Lindane. Phương pháp này thường dựa trên nguyên tắc sử dụng các vi sinh vật có khả năng phân hủy các chất ô nhiễm, nên chúng an toàn, thân thiện với hệ sinh thái và môi trường. Phương pháp phân hủy sinh học là phương pháp ít phức tạp, không đòi hỏi các điều kiện môi trường quá khắt khe, và chi phí thấp; do đó rất phù hợp với điều kiện nước ta. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về vi sinh vật phân giải hiệu quả DDT và Lindane. Trong khi đó, việc sử dụng các chủng vi sinh vật có nguồn gốc ở Việt Nam và có tiềm năng phân giải hiệu quả DDT và Lindane sẽ phù hợp khi ứng dụng thực tế tại Việt Nam. Mặc dù vậy, các nghiên cứu gần đây đã cho thấy hạn chế của việc sử dụng các chủng đơn lẻ trong thực tế, đặc biệt do sự kém linh hoạt trong khả năng thích nghi của chúng với môi trường tự nhiên. Do đó, một xu thế hiện nay là phát triển các chế phẩm vi sinh vật dạng hỗn hợp đa chủng với những tương tác hỗ trợ cho nhau giúp làm tăng hiệu quả xử lý ô nhiễm và tăng khả năng thích ứng với các điều kiện môi trường khác nhau.

Để phát triển các chế phẩm vi sinh đa chủng mới xử lý DDT hoặc Lindane một cách hiệu quả nhất, một cách tiếp cận mới hiện nay là dựa trên đánh giá tiềm năng trao đổi chất và khả năng xử lý ô nhiễm DDT và Lindane thông qua phân tích hệ gen (genome-mining) của vi sinh vật và từ đó xây dựng (*in silico*) những phương án tổ hợp chủng tạo chế phẩm sinh học tiềm năng nhất. Các phương án này sau đó sẽ được khảo sát hiệu quả thực sự trong phòng thí nghiệm và trong thực tế để cuối cùng đưa ra được các chế phẩm sinh học ứng dụng tốt ngoài thực địa để xử lý đất ô nhiễm. Đây cũng là nền tảng để phát triển những quy trình công nghệ sinh học khác biệt giúp xử lý đất ô nhiễm DDT và Lindane ở Việt Nam một cách hiệu quả.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Nghiên cứu phân tích được genome của các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn trong bộ sưu tập giống phân lập tại Việt Nam có khả năng phân giải DDT hoặc Lindane đã được tuyển chọn. Từ đó, dự đoán được các tương tác tiềm năng giữa các chủng tuyển chọn và đưa ra được các tổ hợp chủng tiềm năng có khả năng phân giải hiệu quả DDT hoặc Lindane. Đồng thời, đánh giá được hiệu quả phân giải và khả năng ứng dụng thực tế của các tổ hợp này, qua đó lựa chọn được phương án tối ưu để phát triển chế phẩm sinh học xử lý ô nhiễm DDT hoặc Lindane.

- Xây dựng được quy trình sản xuất chế phẩm sinh học đa chủng xử lý ô nhiễm DDT hoặc Lindane trong đất và bước đầu thử nghiệm được xử lý đất ô nhiễm DDT hoặc Lindane bằng chế phẩm sinh học.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu phân tích hệ gen, dự đoán các tổ hợp tiềm năng, đánh giá hiệu quả phân giải DDT hoặc Lindane và khả năng thích nghi với các điều kiện thực tế của các tổ hợp đó nhằm xây dựng các tổ hợp chủng giúp phân giải hiệu quả DDT hoặc Lindane

Nội dung 2: Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm đa chủng từ các tổ hợp chủng xây dựng được

Nội dung 3: Thử nghiệm xử lý đất ô nhiễm DDT hoặc Lindane bằng chế phẩm sinh học ở quy mô phòng thí nghiệm và bước đầu thử nghiệm xử lý ở mô hình thực tế

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Ý nghĩa khoa học:

Hiện chưa có công trình khoa học nào nghiên cứu và công bố về việc chủ động xây dựng công thức tổ hợp vi sinh vật nhằm phân giải hiệu quả DDT và Lindane. Ngoài ra, cách tiếp cận sử dụng các kỹ thuật mới như giải trình tự toàn hệ gen và khai thác hệ gen nhằm đánh giá triệt để tiềm năng trao đổi chất và xử lý ô nhiễm cũng chưa được áp dụng cho các nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học của vi sinh vật. Phát hiện về khả năng phân giải DDT và Lindane của các chủng, đặc biệt là tương tác của các chủng trong các tổ hợp chủng khác nhau là một đóng góp mới cho khoa học. Đặc biệt, những chủng bản địa có nguồn gốc tại Việt Nam và có tiềm năng phân giải hiệu quả DDT và Lindane sẽ phù hợp khi ứng dụng thực tế tại Việt Nam.

Ý nghĩa thực tiễn:

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học và công nghệ xử lý DDT, Lindane bằng các chế phẩm được nghiên cứu và phát triển trong luận án này có ý nghĩa quan trọng trong việc cải thiện chất lượng đất ô nhiễm, giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm môi trường và tác động tiêu cực đến sức khỏe cộng đồng do hai chất độc này gây ra. Thực tế hiện nay cho thấy, nhiều khu vực

tại Việt Nam vẫn còn tồn dư DDT và Lindane trong đất, trong khi các phương pháp xử lý hóa – lý đang được áp dụng thường có chi phí cao và hiệu quả chưa triệt để.

Trong bối cảnh đó, chế phẩm sinh học tổ hợp vi sinh được xây dựng từ các chủng vi sinh vật bản địa có khả năng phân giải DDT và Lindane, được thử nghiệm trong điều kiện thực tế tại Việt Nam, mang lại hiệu quả xử lý cao và phù hợp với điều kiện trong nước. Bên cạnh đó, quy trình công nghệ xử lý được thiết kế đơn giản, chi phí thấp và dễ triển khai tại các vùng nông thôn – nơi hiện nay vẫn còn nhiều khu vực bị ô nhiễm DDT và Lindane – góp phần tạo ra giải pháp khả thi, bền vững và thân thiện với môi trường. Đặc biệt, chế phẩm sinh học xử lý DDT và Lindane vẫn chưa xuất hiện trên thị trường. Do đó, chế phẩm được nghiên cứu hứa hẹn sẽ là một sản phẩm mới hấp dẫn cho các doanh nghiệp hoặc địa phương có nhu cầu.

5. Những đóng góp mới của đề tài

+ Lần đầu tiên nghiên cứu xây dựng công thức tổ hợp vi sinh vật phân giải DDT hoặc Lindane hiệu quả cao, trên cơ sở sử dụng cách tiếp cận phân tích hệ gen (genome-mining) để lựa chọn và phối hợp các chủng vi sinh vật tối ưu.

+ Đề xuất và phát triển thành công chế phẩm sinh học đa chủng có khả năng phân giải hiệu quả DDT hoặc Lindane, đồng thời xây dựng được quy trình công nghệ xử lý đất bị ô nhiễm bởi hai hợp chất này bằng các chế phẩm đã tạo ra. Quy trình đã được thử nghiệm và chứng minh hiệu quả cao.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

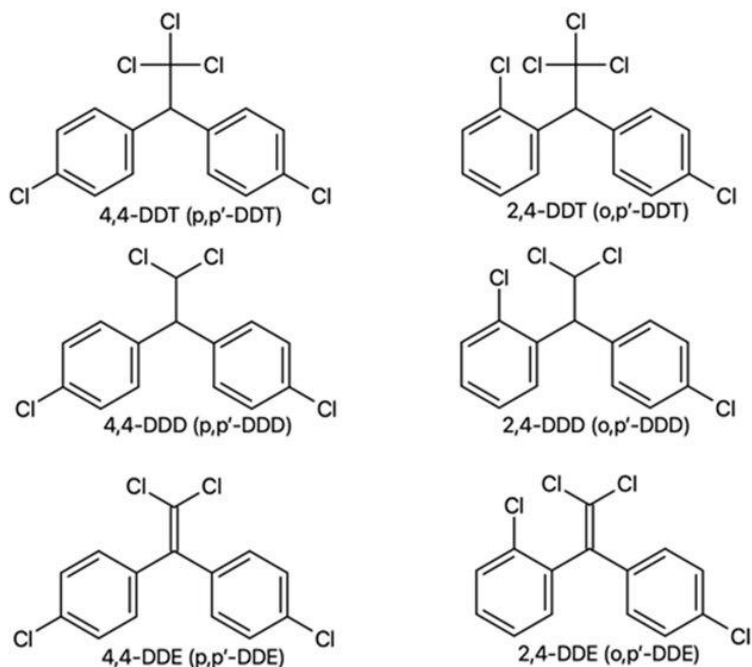
1.1 Tổng quan chung về thực trạng ô nhiễm và tồn dư DDT và Lindane

1.1.1 Giới thiệu về DDT

DDT (dichloro-diphenyl-trichloroethane) được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1873 bởi Othmar Zeidler và được nhà hóa học Thụy Sĩ Paul Herman Muller sử dụng rộng rãi như một loại thuốc trừ sâu từ năm 1939. Trong y tế, DDT được sử dụng để điều trị bệnh sốt rét, sốt phát ban và các bệnh khác do côn trùng gây ra ở người trong Thế chiến thứ hai. Nhờ vậy, số binh sĩ chết vì bệnh sốt rét đã giảm từ 400 000 vào năm 1946 xuống dưới 10 vào năm 1950. Trong nông nghiệp, DDT được sử dụng để kiểm soát các loài gây hại như sâu đục thân ngô, sâu đục quả chín, ... Nhờ hiệu quả nhanh chóng, DDT được sử dụng rộng rãi ở Hoa Kỳ và nhiều quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên, DDT gây ra những hậu quả nguy hiểm đối với sức khỏe con người, sinh vật, cũng như ảnh hưởng đến môi trường tự nhiên, như làm tăng tính kháng thuốc ở nhiều loài côn trùng gây hại ảnh hưởng đến mùa màng [121]. Theo Công ước Stockholm về các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy, hiệp ước môi trường quốc tế được ký vào tháng 5 năm 2004 quyết định loại bỏ sản xuất, sử dụng DDT trong vai trò làm thuốc trừ sâu.

DDT có công thức hóa học $C_{14}H_9Cl_5$ và khối lượng phân tử là 354,5 g/mol, thuộc nhóm hợp chất hữu cơ hai vòng thơm chứa gốc chloride trong phân tử. Hỗn hợp DDT kỹ thuật được sử dụng trong phòng trừ sâu có chứa 14 các đồng phân khác nhau của DDT (Hình 1.1), trong đó, thành phần chủ đạo (chiếm từ 65-80%) là đồng phân có hoạt tính p,p-DDT [73].

Ở dạng tự nhiên, DDT là một hợp chất không màu, không mùi, kỵ nước, có khả năng hòa tan tốt trong dung môi hữu cơ và chất béo. Do tính chất ổn định với nhiệt và ánh sáng, DDT dễ hấp thụ vào đất, khuếch tán rộng trong môi trường. Đồng thời, do tính chất độc hại cũng như khả năng tích lũy sinh học với nồng độ cao theo chuỗi thức ăn, DDT đã gây nhiều tác động tiêu cực đến các loài sinh vật.



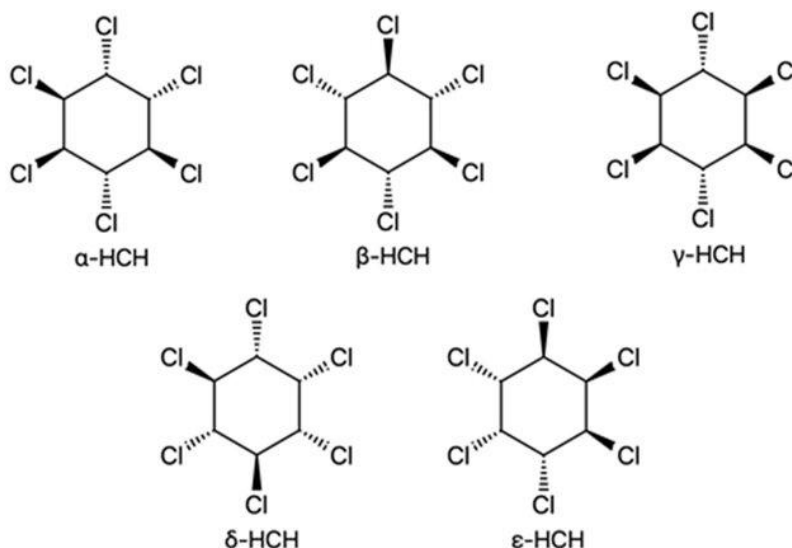
Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của DDT và các chất chuyển hóa phổ biến [43]

1.1.2 Giới thiệu về Lindane

Lindane còn được biết đến là gamma - hexachlorocyclohexane (γ - HCH), được tổng hợp vào năm 1852 bởi nhà khoa học người Anh Michael Faraday bằng cách cho benzen phản ứng với chloride dưới ánh sáng mặt trời. Nhưng đến năm 1912, tên của loại hóa chất này đã được đặt theo tên của nhà hóa học người Hà Lan Teunis van der Linden, người đầu tiên phân lập được γ -hexachlorocyclohexane tinh khiết. Đây là một loại thuốc trừ sâu gốc chloride hữu cơ được sản xuất hàng loạt từ những năm 1940 cho cả mục đích nông nghiệp và dược phẩm. Trong nông nghiệp, Lindane đã được sử dụng làm thuốc trừ sâu để xử lý hạt giống, cây trồng và gỗ, cũng như xử lý các loại ký sinh trên gia súc. Vào những năm 1950, Lindane lần đầu tiên được giới thiệu như một loại thuốc trị ghẻ dùng cho người [82]. Tuy nhiên, do những tác động có hại đến con người và môi trường, việc sử dụng Lindane với mục đích trừ sâu đã bị cấm kể từ năm 2009 nhưng vẫn được sản xuất và sử dụng cho các mục đích y tế theo công ước Stockholm.

Lindane ($C_6H_6Cl_6$) với khối lượng phân tử là 290,9 g/mol được sản xuất bằng cách quang hóa benzen bằng tia UV thu được một tổ hợp gồm nhiều đồng phân là 1,2,3,4,5,6 hexachlorocyclohexane (HCH). Công thức HCH là tổ hợp của các đồng phân khác nhau, chủ

yếu là α -(53–80%), β -(5%–14%), γ -(8%–15%), δ -HCH (2%–16%) và ϵ -HCH (3–5 %). Tuy nhiên, γ -HCH là đồng phân duy nhất có hoạt tính diệt côn trùng [113].



Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của Lindane và các đồng phân [43]

Lindane là một chất rắn kết tinh màu trắng, có mùi mốc nhẹ (mùi của HCH là do tạp chất), ít tan trong nước nhưng lại hòa tan tốt trong dung môi hữu cơ. Lindane ổn định với ánh sáng, không khí, nhiệt, CO_2 và axit mạnh. Do Lindane có tính ổn định, ưa ẩm và dễ bị bay hơi, chất này dễ tích lũy sinh học theo chuỗi thức ăn và khuếch tán rộng trong môi trường.

1.2 Hiện trạng và tác hại của DDT và Lindane đến con người và môi trường

Mặc dù Công ước Stockholm đã cấm hoàn toàn việc sử dụng DDT trong nông nghiệp, nhiều quốc gia châu Phi và châu Á vẫn áp dụng hóa chất này cho mục đích y tế, đặc biệt để phòng chống sốt rét. Theo Henk van den Berg và cộng sự (2017), đến nay chỉ còn năm nước là Botswana, Gambia, Namibia, Swaziland và Zimbabwe là vẫn tiếp tục dùng DDT để kiểm soát bệnh này. Sản lượng DDT toàn cầu giảm khoảng 32% trong giai đoạn 2001–2014 (từ 5,144 xuống 3,491 tấn/năm), trong khi lượng tiêu thụ cũng giảm khoảng 30%, từ trung bình 5,388 tấn/năm (2001–2007) xuống 3,772 tấn/năm (2008–2014). Trong đó, Ấn Độ vẫn là quốc gia sản xuất và sử dụng DDT lớn nhất, tiêu thụ khoảng 5,000 tấn năm 2004 và duy trì trên 3,000 tấn/năm trong giai đoạn 2006–2014 [112]. Bên cạnh đó, DDT là hợp chất khó phân hủy do thời gian bán phân hủy có thể lên đến 30 năm do đó hàm lượng tồn dư cao trong nước và

đất. Đây cũng là hợp chất ít tan trong nước, dễ liên kết với chất hữu cơ trong đất, tích lũy trong mô mỡ và khuếch đại sinh học qua chuỗi thức ăn, nên đã được phát hiện cả ở các khu vực xa xôi như Bắc Cực và Nam Cực. Năm 2020, một cuộc điều tra cho rằng, nhiều thập kỷ trước, các công ty sản xuất DDT đã đánh chìm các thùng DDT bị rò rỉ sâu xuống Thái Bình Dương ngoài khơi bờ biển California thay vì tiêu hủy đúng cách. Ảnh hưởng của ô nhiễm DDT đối với cá và các sinh vật biển khác đã tồn tại trong nhiều thập kỷ [112]. Các chất DDT và chuyển hóa của nó có thể xâm nhập cơ thể chủ yếu qua thực phẩm như thịt, cá, sữa, gia cầm, ... gây nhiều tác hại: rối loạn thần kinh, nội tiết, sinh sản, suy giảm miễn dịch, độc gan và có khả năng gây ung thư (IARC/WHO). Chất chuyển hóa DDE còn liên quan đến nguy cơ ung thư vú, ung thư tinh hoàn và béo phì ở nữ giới. Tác động của DDT lên ty thể cũng được xem là một cơ chế quan trọng gây tổn thương gan và ung thư [56].

Đối với Lindane, chất này được sử dụng cho mục đích nông nghiệp từ năm 1950 đến năm 2000 ước tính khoảng 450,000 tấn. Trong đó, số lượng sử dụng ở Châu Á là 73,000 tấn, Châu Âu là 280,000 tấn, Châu Mỹ là 64,000 tấn và Châu Phi là 29,000 tấn. Các ứng dụng rộng rãi của Lindane gây ra các mối đe dọa nghiêm trọng đối với môi trường. Lindane có xu hướng hấp phụ vào vật liệu hữu cơ khó phân hủy; do đó, nó có thể tồn tại lâu dài. Lindane được tìm thấy ở rất nhiều nơi như trong không khí, nước, đất và trầm tích, cũng như trong các sinh vật dưới nước và trên cạn vì thời gian bán phân hủy của Lindane trong đất và nước lần lượt là 708 và 2292 ngày [26]. Mặc dù lệnh cấm toàn cầu đối với Lindane như một loại thuốc trừ sâu nông nghiệp sẽ làm giảm tác động môi trường của nó, nhưng việc tiếp tục sử dụng nó trong y tế cũng có thể gây ra những lo ngại về môi trường.

Các chất thải từ Lindane cũng gây nguy hại cho sinh vật và con người. Năm 2009, các đồng phân HCH được định nghĩa là chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy trong Công ước Stockholm và từ năm 2015, Lindane được Tổ chức Y tế Thế giới đưa vào danh sách chất gây ung thư cho con người [114]. Với hiệu quả diệt sâu hại cao, Lindane nhanh chóng trở nên phổ biến và được sử dụng trong nông nghiệp trên toàn thế giới. Tuy nhiên, các nghiên cứu sau đó về Lindane đã chỉ ra nhiều tác động tiêu cực của hóa chất trừ sâu này lên sức khỏe của con người và động vật. Ở động vật có vú, ngộ độc Lindane cấp tính có thể dẫn đến suy giảm chức năng hô hấp, run toàn thân, co giật và thậm chí tử vong [86]. Với người, Lindane gây độc

thần kinh và sự phơi nhiễm Lindane kéo dài có thể dẫn đến nhiều triệu chứng nghiêm trọng trên toàn cơ thể như suy giảm chức năng gan, rối loạn nhịp tim và thay đổi kinh nguyệt [82]. Các nghiên cứu khác về các trường hợp tử vong do độc tính của Lindane cũng phát hiện ra sự thoái hóa của cơ tim, gan bị nhiễm mỡ và hoại tử các mạch não, phổi và thận [123].

Tại Việt Nam, việc khảo sát số lượng lớn mẫu đất ở miền Bắc và miền Nam Việt Nam cho thấy những mẫu đất nông nghiệp có tồn dư thuốc bảo vệ thực vật lớn hơn so với những mẫu đất trên vùng cao, thể hiện rõ rằng chất này đã được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp trước đây [77]. Yang Ding và cộng sự (2024) báo cáo dư lượng DDT và HCH vẫn tồn tại phổ biến trong đất nông nghiệp Việt Nam, đặc biệt ở các vùng trước đây từng lưu trữ hoặc sử dụng thuốc trừ sâu. Nồng độ tổng DDT trong đất trung bình là 0,006 ppm, trong khi tổng HCH là 0,000043 ppm. Các đồng phân p,p'-DDT, p,p'-DDE và β -HCH vẫn chiếm ưu thế, chứng tỏ sự tồn lưu dài hạn và quá trình phân giải chậm của các hợp chất này trong điều kiện nhiệt đới ẩm của Việt Nam [42]. Cũng trong nghiên cứu này, khi phân tích hàm lượng DDT và Lindane (HCH) thấy rằng mặc dù hàm lượng HCH hiện nay còn khá thấp nhưng hàm lượng DDT vẫn còn rất cao như 0,085 ppm và 0,047 ppm. Mặc dù mức độ ô nhiễm có xu hướng giảm nhờ lệnh cấm sử dụng DDT và HCH từ cuối thập niên 1990, sự tồn tại lâu dài của các đồng phân bền như β -HCH và p,p'-DDE cho thấy nguy cơ phát tán thứ cấp vẫn còn.

Trước đây, ở Việt Nam, gần 9000 tấn DDT và Lindane được nhập khẩu mỗi năm từ Liên Xô cũ, với mục đích phòng ngừa bệnh sốt rét và phục vụ nông nghiệp. Khối lượng DDT đã được sử dụng là 315 tấn năm 1961 và giảm còn 22 tấn vào năm 1974. Số lượng thống kê cho thấy DDT nhập vào Việt Nam để kiểm soát bệnh sốt rét từ năm 1975 đến năm 1990 là 24,042 tấn [77]. Trong khi đó, Lindane được sử dụng nhiều nhất ở Việt Nam từ những năm 1960-1993 với vai trò là thuốc diệt sâu bọ, nấm bệnh và ứng dụng trong bảo quản nông sản. Ngoài ra, Lindane cũng được sử dụng trong y tế để diệt côn trùng truyền bệnh hay các bệnh liên quan đến chấy, ghẻ. Hơn nữa, chất này không những được sử dụng nhiều mà còn đã từng được sản xuất nhiều ở Việt Nam. Đơn cử, nhà máy hóa chất Việt Trì có công suất sản xuất Lindane là 200 tấn/năm với nồng độ là 13% vào năm 1961. Ở giai đoạn đó, nồng độ thuốc trừ sâu Lindane trong nước thải của nhà máy Việt Trì vượt quá 121 lần tiêu chuẩn cho phép. Vào

năm 2006, theo Quyết định số 31/2006/QĐ-BNN của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Lindane được đưa vào vào danh mục thuốc bảo vệ thực vật bị cấm sử dụng ở Việt Nam.

Theo Quyết định số 1946/QĐ-TTg ngày 21 tháng 10 năm 2010 của Thủ tướng Chính phủ và Báo cáo của Bộ Tài Nguyên và Môi Trường về xử lý, phòng ngừa ô nhiễm môi trường do hóa chất bảo vệ thực vật tồn lưu, có tới hơn 200 địa điểm khu vực tồn lưu các chất bảo vệ thực vật gây nguy cơ cao đến sức khỏe con người và môi trường. Một số điểm nóng trọng điểm tập trung tại tỉnh Nghệ An và tỉnh Hà Tĩnh, cùng với một số địa điểm khác ở Thanh Hóa, Thái Bình, Nam Định,... Riêng tại tỉnh Nghệ An, ngày 10/01/2020, UBND tỉnh Nghệ An ban hành Quyết định số 101/QĐ-UBND phê duyệt bổ sung 02 điểm tồn lưu thuốc bảo vệ thực vật tại xã Nghĩa Tân và xã Nghĩa Phú. Theo đó, khu vực Nghĩa Đàn có tổng cộng 23 điểm tồn lưu thuốc bảo vệ thực vật. Trong đó, tại xã Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An, nhiều hộ gia đình hiện vẫn sinh sống trong khu vực có đất ô nhiễm DDT với hàm lượng từ vài chục đến vài trăm, thậm chí hàng nghìn ppm. Tương tự, tại xã Đức Thọ và xã Việt Xuyên, tỉnh Hà Tĩnh, nhiều địa điểm từng là kho lưu trữ thuốc bảo vệ thực vật cũ đã được ghi nhận. Tại các khu vực này, nhiều hộ dân sinh sống xung quanh có người mắc bệnh ung thư, đồng thời hàm lượng thuốc bảo vệ thực vật tồn dư trong đất được ghi nhận ở mức từ vài chục đến vài trăm ppm.

1.3 Các phương pháp xử lý ô nhiễm, tồn dư DDT và Lindane

1.3.1 Tình hình chung trên thế giới

Phương pháp vật lý – hóa học

DDT và Lindane là các hợp chất hữu cơ có cấu trúc vòng thơm bền vững, khó bị phân hủy trong điều kiện tự nhiên. Do đó, tại nhiều quốc gia, chôn lấp vẫn được áp dụng như một giải pháp quản lý chất thải nguy hại, đặc biệt trong bối cảnh các công nghệ xử lý tiên tiến chưa được triển khai rộng rãi. Phương pháp này đòi hỏi hệ thống hố chôn lấp phải được thiết kế theo tiêu chuẩn kỹ thuật nghiêm ngặt nhằm đảm bảo độ ổn định và hạn chế phát tán các chất ô nhiễm ra môi trường. Tuy nhiên, đây không phải giải pháp an toàn tuyệt đối, vì hóa chất có thể theo dòng rỉ thấm ra môi trường, lan tới suối, sông, hồ và cuối cùng xâm nhập tầng nước ngầm. Trên thực tế, bãi chôn lấp Sardas và Bailín ở Tây Ban Nha, nơi tiến hành chôn lấp các sản phẩm thải của Lindane, được báo cáo là gây rò rỉ nhiều chất gây ô nhiễm thứ

cấp gồm dioxin, furan và PCDD/F [51]. Tương tự, một nghiên cứu tại 5 điểm chôn lấp thuốc bảo vệ thực vật ở Tanzania ghi nhận sự tồn lưu đáng kể của DDT, DDE, DDD, HCH và các hợp chất hữu cơ clo khác (OCPs) trong đất. Mẫu được thu ở các độ sâu tới 220 cm và ghi nhận nồng độ DDT và HCH tổng lên đến hàng nghìn mg/kg, phản ánh quá trình phân hủy rất chậm và khả năng tích tụ lâu dài. Nồng độ các chất ô nhiễm có xu hướng giảm dần theo khoảng cách từ điểm chôn lấp, nhưng vẫn xuất hiện sự tích tụ ở tầng sâu, cho thấy nguy cơ rò rỉ và ô nhiễm nước ngầm nghiêm trọng [71].

Xử lý nhiệt là một phương pháp phổ biến khác để loại bỏ thuốc trừ sâu, trong đó các hợp chất hữu cơ khó phân hủy được đồng xử lý trong lò nung xi măng hoặc lò luyện kim hoạt động ở nhiệt độ cao. Phương pháp này hiện vẫn được xem là một trong những công nghệ hiệu quả nhất để tiêu hủy triệt để các hợp chất POPs như DDT và Lindane. Ưu điểm nổi bật của phương pháp này là khả năng đạt hiệu suất phá hủy rất cao trong thời gian ngắn, thường đạt trên 99,9%, nhờ các điều kiện nhiệt độ cao và thời gian lưu thích hợp trong lò nung. Quá trình đồng xử lý trong lò xi măng hoặc lò luyện kim còn cho phép tận dụng nhiệt lượng sẵn có, qua đó giảm đáng kể lượng chất thải cuối cùng và tránh được nhu cầu xây dựng các cơ sở xử lý chuyên biệt. Tuy vậy, quá trình này có thể phát sinh các chất ô nhiễm thứ cấp như dioxin, furan và nhiều loại khí độc khác [85]. Hai chất độc thứ cấp là polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) and polychlorinated dibenzofurans (PCDF) được ghi nhận là sản phẩm của quá trình xử lý nhiệt DDT [47]. Một số nghiên cứu đã đề xuất bổ sung các chất hỗ trợ, chẳng hạn kích hoạt persulfate để tăng khả năng phân hủy Lindane, nhằm hạn chế sự hình thành các sản phẩm phụ [85]. Dù vậy, những yêu cầu nghiêm ngặt về thiết bị và điều kiện xử lý POPs ở nhiệt độ cao vẫn là thách thức lớn cho việc vận hành và áp dụng phương pháp này trên diện rộng.

Phương pháp oxy hóa hóa học cũng được sử dụng để hạn chế sự phát tán của chất ô nhiễm và phân giải hiệu quả chất ô nhiễm *in-situ* [16]. Các chất oxy hóa phổ biến là permanganat, hydro peroxide và sắt, persulfate và ozone. Trong quá trình xử lý chất ô nhiễm bằng phương pháp oxy hóa hóa học, nhiều phản ứng khác nhau cần được xảy ra để đảm bảo phân giải triệt để chất ô nhiễm [16]. Nhược điểm của phương pháp này đòi hỏi yêu cầu kỹ

thuật phức tạp do đó khiến cho phương pháp này thường khá tốn kém. Hơn nữa, các chất xúc tác được sử dụng có thể là nguồn ô nhiễm thứ cấp.

Có thể thấy rằng, các phương pháp xử lý vật lý – hóa học mang lại nhiều lợi thế như tốc độ xử lý nhanh và hiệu quả cao. Tuy nhiên, điểm hạn chế chung của chúng là chi phí vận hành khá lớn, khiến việc áp dụng trên diện rộng, đặc biệt ở các quốc gia đang phát triển, gặp nhiều khó khăn. Bên cạnh đó, quá trình phân hủy bằng hóa-lý có thể tạo ra các sản phẩm phụ, làm tăng nguy cơ tái ô nhiễm môi trường. Vì vậy, nhu cầu tìm kiếm giải pháp thay thế thân thiện hơn với môi trường ngày càng được quan tâm. Trong bối cảnh đó, các công nghệ xử lý sinh học được đánh giá cao nhờ tính bền vững, an toàn sinh thái và tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong xử lý các hợp chất hữu cơ độc hại.

Phương pháp sinh học

Các công nghệ xử lý sinh học dựa trên việc khai thác hoạt động của các thành phần sinh học nhằm phân giải, loại bỏ hoặc chuyển hóa các chất ô nhiễm thành những dạng có độc tính thấp hoặc không còn gây hại cho môi trường. Phương pháp này có khả năng khoáng hóa hoàn toàn các hợp chất ô nhiễm hoặc chuyển hóa chúng thành các sản phẩm an toàn hơn, đồng thời hạn chế sự hình thành các chất ô nhiễm thứ cấp. Bên cạnh đó, quy trình xử lý sinh học thường có mức độ an toàn cao, ít tiềm ẩn rủi ro đối với sức khỏe con người và có khả năng thích ứng tốt với sự biến động của các điều kiện môi trường. Các đối tượng sinh học được sử dụng trong xử lý ô nhiễm rất đa dạng, từ vi sinh vật như vi khuẩn, nấm, tảo đến thực vật, hoặc sự kết hợp của nhiều nhóm sinh vật khác nhau.

Đối với các hợp chất hữu cơ chứa clo, điển hình là DDT và Lindane, quá trình xử lý sinh học có thể diễn ra thông qua nhiều cơ chế khác nhau như: (i) tích tụ sinh học (bioaccumulation) thông qua khả năng giữ hoặc kết tủa các chất này nhờ sinh vật, hay (ii) hấp phụ sinh học (biosorption) thông qua khả năng hấp phụ các chất này lên các cấu trúc sinh vật, hoặc (iii) chuyển hóa sinh học (biotransformation) thông qua khả năng chuyển hóa các chất này thành các sản phẩm khác ít độc hơn của sinh vật, đặc biệt là vi sinh vật [32]. Các biện pháp xử lý sinh học DDT và Lindane bao gồm hai nhóm chính là sử dụng thực vật (phytoremediation) và sử dụng vi sinh vật để phân giải [36]. Các vi sinh vật phân giải được DDT và Lindane là các vi sinh vật có khả năng tận dụng chất này như là nguồn carbon hoặc chất nhận electron [106]. So với các biện pháp xử lý hóa lý truyền thống, xử lý sinh học được

xem là giải pháp hiệu quả và bền vững trong khắc phục ô nhiễm môi trường do có thể xử lý đất ô nhiễm *in situ*, thân thiện với môi trường và có tính bền vững cao. Mặt khác, sử dụng vi sinh vật cũng đem lại tính linh động cao cho phương pháp khi vi sinh vật có thể thích ứng với nhiều điều kiện môi trường khác nhau và trong một số trường hợp, vi sinh vật có thể trải qua quá trình biến đổi di truyền để có thêm khả năng phân giải các chất lạ sinh học (xenobiotic).

1.3.2 Tình hình tại Việt Nam

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu các công nghệ xử lý ô nhiễm DDT và Lindane vẫn còn hạn chế. Trần Đình Trinh và cộng sự (2020) đã tiến hành thí nghiệm 6 tháng tại Bắc Giang, kết hợp trồng cỏ vetiver với các mức bổ sung nano-Fe₃O₄ khác nhau để xử lý đất ô nhiễm thuốc trừ sâu chloride hữu cơ [108]. Kết quả cho thấy hệ số tốc độ phân hủy DDE tăng theo nồng độ nano-Fe₃O₄, đạt 0,264; 0,350; và 0,434 theo tháng lần lượt tương ứng với 0, 25 và 100 mg/kg nano-Fe₃O₄ [108]. Ngoài ra, công nghệ Phyto-Fenton cũng được thử nghiệm tại đất nhiễm DDT ở Cẩm Bình, Hà Tĩnh cho hiệu quả xử lý đạt 98,4% còn Lindane nồng độ phát hiện ở mức rất thấp [38].

Với các nghiên cứu theo cách tiếp cận sinh học, tính đến thời điểm hiện tại, Việt Nam mới chỉ ghi nhận các nghiên cứu của nhóm Đặng Thị Cẩm Hà và cộng sự, trong đó chủng nấm FNA1 có thể xử lý trên 92% hỗn hợp DDT và DDE ở nồng độ 200 ppm sau 7 ngày nuôi cấy, còn chủng FNA4 đạt mức phân hủy 94,48% hỗn hợp này sau 14 ngày [3]. Ngoài ra, nhóm Đặng Thị Cẩm Hà và cộng sự cũng báo cáo chủng FNA33 có khả năng phân giải Lindane lên đến 88% sau 14 ngày [3]. Đặc biệt, chưa có nghiên cứu nào về các vi khuẩn và xạ khuẩn phân giải DDT và Lindane ở Việt Nam.

Các phương pháp phân giải sinh học nhìn chung có nhiều ưu điểm về khả năng phân giải và tính thân thiện với môi trường do không gây phát sinh các sản phẩm ô nhiễm thứ cấp. Phương pháp xử lý sinh học nhờ vi sinh vật là phương pháp được nghiên cứu phát triển mạnh nhất.

1.4 Vi sinh vật phân giải DDT và Lindane

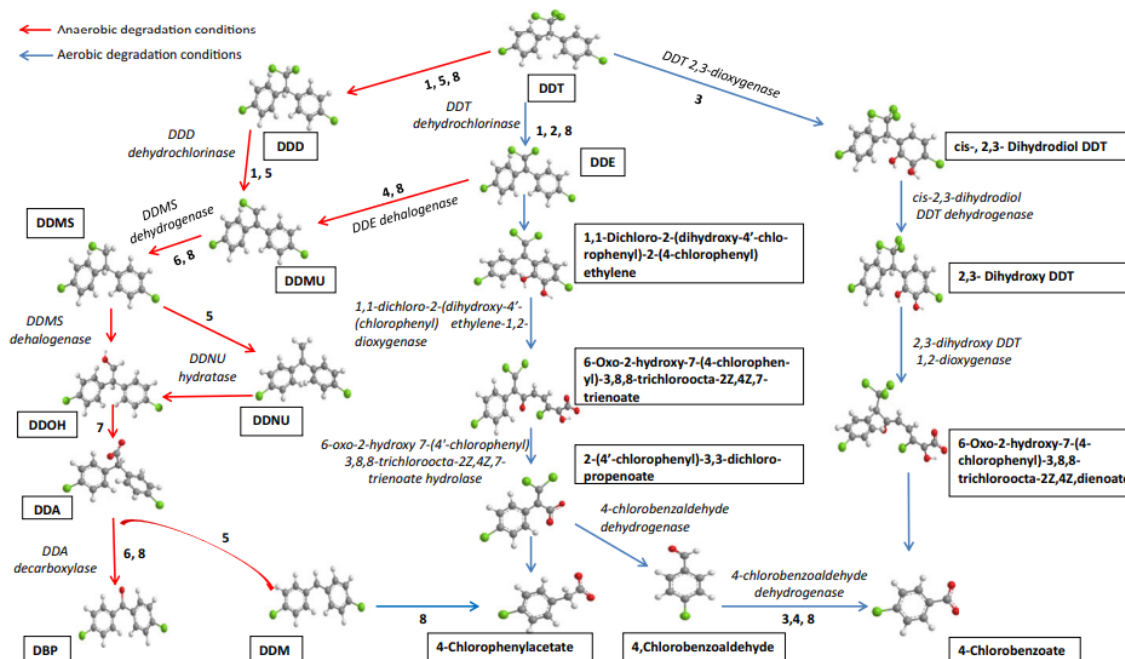
Vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ các hợp chất độc hại nhờ khả năng tổng hợp các enzyme chuyên biệt tham gia vào quá trình phân giải các loại thuốc bảo vệ

thực vật [13]. Quá trình phân giải sinh học các hóa chất bảo vệ thực vật chủ yếu dựa trên hoạt động của quần xã vi sinh vật bản địa tồn tại trong môi trường đất, nơi các chất ô nhiễm được chuyển hóa thành các sản phẩm cuối cùng ít độc hoặc không độc trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Trong bối cảnh hiện nay, xử lý ô nhiễm bằng vi sinh vật đang được đặc biệt quan tâm và ưu tiên phát triển nhờ những ưu thế như kỹ thuật triển khai tương đối đơn giản, tiềm năng áp dụng xử lý tại chỗ, hiệu quả lâu dài với chi phí hợp lý, đồng thời đảm bảo an toàn cho sức khỏe con người và hệ sinh thái, góp phần hướng tới phát triển bền vững.

1.4.1 Phân giải sinh học DDT nhờ vi sinh vật

Việc loại bỏ nguyên tử chlorine ra khỏi cấu trúc phân tử là một bước quan trọng trong phân giải DDT [73]. Việc loại chlorine (*dechlorination*) này có thể xảy ra tự phát do cấu trúc phân tử không bền hoặc diễn ra nhờ sự xúc tác bởi các enzyme đặc hiệu [55]. Quá trình phân giải DDT có thể diễn ra trong cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Theo tổng hợp của Xiao và cộng sự (2011), cơ chế phổ biến của vi sinh vật trong phân giải DDT trong điều kiện kỵ khí là loại chlorine hóa theo kiểu khử (*reductive dechlorination*); còn cơ chế phân giải trong điều kiện hiếu khí là loại hydrochlorine (*dehydrochlorination*) [124]. Các con đường phân giải DDT được tổng hợp trong Hình 1.3.

Phân hủy sinh học kỵ khí là sự phân hủy các hợp chất hữu cơ ô nhiễm bởi vi sinh vật trong điều kiện không có oxy. Vi sinh vật sử dụng một chất khác ngoài oxy làm chất nhận điện tử; trong một số trường hợp, bản thân chất ô nhiễm có thể đóng vai trò chất nhận điện tử [109]. Khả năng phân hủy DDT trong điều kiện kỵ khí được biết đến chủ yếu là quá trình khử loại chloride. Phản ứng diễn ra bởi sự khử gốc chloride và thay bằng nguyên tử hydro. Con đường phân giải DDT trong điều kiện kỵ khí có thể được hiểu rõ hơn qua nghiên cứu về khả năng phân giải DDT ở *Aeromonas hydrophila* HS01 như sau: sau khi hình thành DDD, sản phẩm này sẽ được tiếp tục bị loại chloride để tạo DDMS; tương tự, DDMS sẽ được chuyển thành DDNS; các phản ứng oxy hóa sau đó sẽ chuyển DDMS và DDNS thành DDOH và DBP; hai chất DDOH và DBP không được quan sát thấy biến đổi tiếp trong điều kiện kỵ khí [34]. Tuy nhiên, con đường trao đổi hiếu khí và kỵ khí phân hủy DDT của vi sinh vật có những sản phẩm trùng lặp với nhau, điều này cho thấy hai con đường phân giải này có mối liên hệ thống nhất.



Hình 1.3. Các con đường chuyển hóa phân hủy sinh học DDT [73]

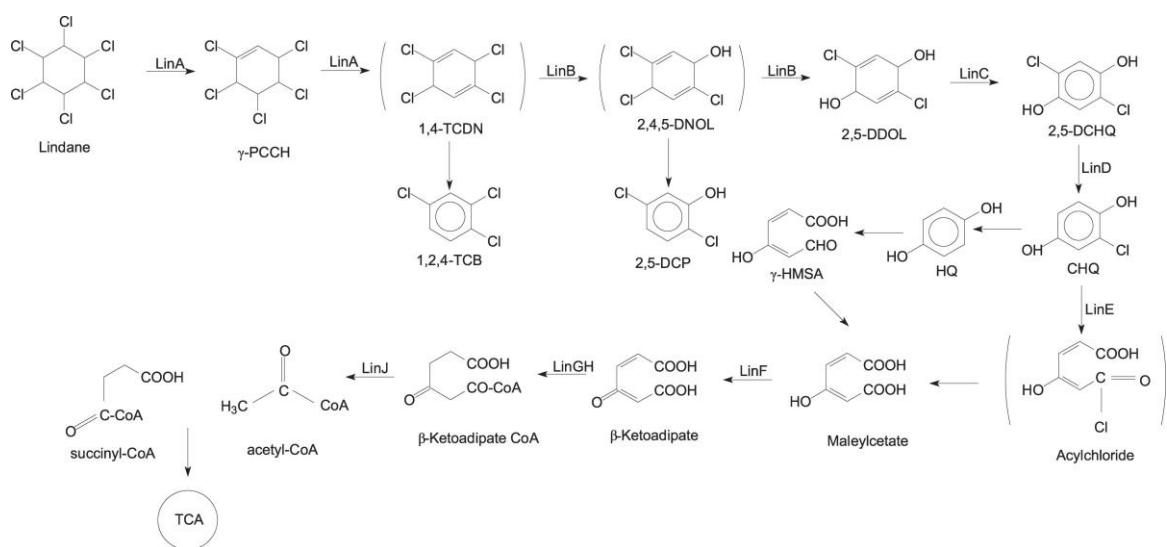
Ghi chú: màu xanh (hiếu khí); màu đỏ (kị khí). DDT: 1,1,1-dichlorodiphenyl trichloroethane; DDE: 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene; DDD: 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane; DDMU: 1-chloro-2,2-bis(4'-chlorophenyl)ethylene; DDMS: 1-chloro-2,2-bis(4'-chlorophenyl)ethane; DDNU: 1,1-bis(4-chlorophenyl)ethylene; DDOH: 2,2-bis(4'-chlorophenyl)ethanol; DDA: 2,2-bis(p-chlorophenyl)acetate; DBP: 4,4'-dichlorobenzophenone; DDM: bis(4'-chlorophenyl)methane. 1 *Proteus vulgaris*, 2 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Ralstonia eutropha* A5, 4 *Pseudomonas acidovorans* M3GY, 5 *Aeromonas hydrophila*, 6 *Pseudomonas putida*, 7 *Bacillus* sp., 8 *Chryseobacterium* sp. PYR2

Phân hủy sinh học hiếu khí là sự phân hủy các hợp chất hữu cơ ô nhiễm bởi vi sinh vật trong điều kiện có oxy. Vi sinh vật sử dụng oxy làm chất nhận điện tử để tạo ra năng lượng. Cụ thể, oxy được sử dụng để oxy hóa cacbon trong chất ô nhiễm một phần hoặc hoàn toàn. Một chủng vi khuẩn điển hình phân hủy DDT trong điều kiện hiếu khí là *R. eutropha* A5, đã được Nadeau nghiên cứu làm rõ con đường chuyển hóa [80]. Bước đầu tiên trong con đường này là oxy hóa DDT ở vị trí ortho và meta tạo chất trung gian 2,3-dihydrodiol-DDT. Sản phẩm này sau đó sẽ được tiếp tục phân giải thành 2,3-dihydroxy-DDT bởi một enzyme dehydrogenase. 2,3-dihydroxy-DDT trải qua phản ứng cắt mở vòng meta và cuối cùng sẽ được dị hóa thành 4-chlorobenzoate (4-CBA), sản phẩm cuối cùng trong con đường phân giải

của *R. eutropha* A5. Một nghiên cứu khác cho thấy, một chủng *Pseudomonas* sp. cũng có khả năng phân hủy DDT thành 4-CBA thông qua con đường tương tự [62].

1.4.2 Phân giải sinh học Lindane nhờ vi sinh vật

Lindane (γ -hexachlorocyclohexane) có thể được chuyển hóa thông qua nhiều con đường trao đổi chất khác nhau, phụ thuộc vào loại vi sinh vật. Lindane có thể bị phân giải trong cả môi trường hiếu khí và kỵ khí. Tuy nhiên, quá trình khoáng hóa hoàn toàn thường chỉ xảy ra trong điều kiện hiếu khí và thường cần sự phối hợp của nhiều chủng vi khuẩn, hiếm khi chỉ một chủng riêng lẻ có thể thực hiện [13, 132].



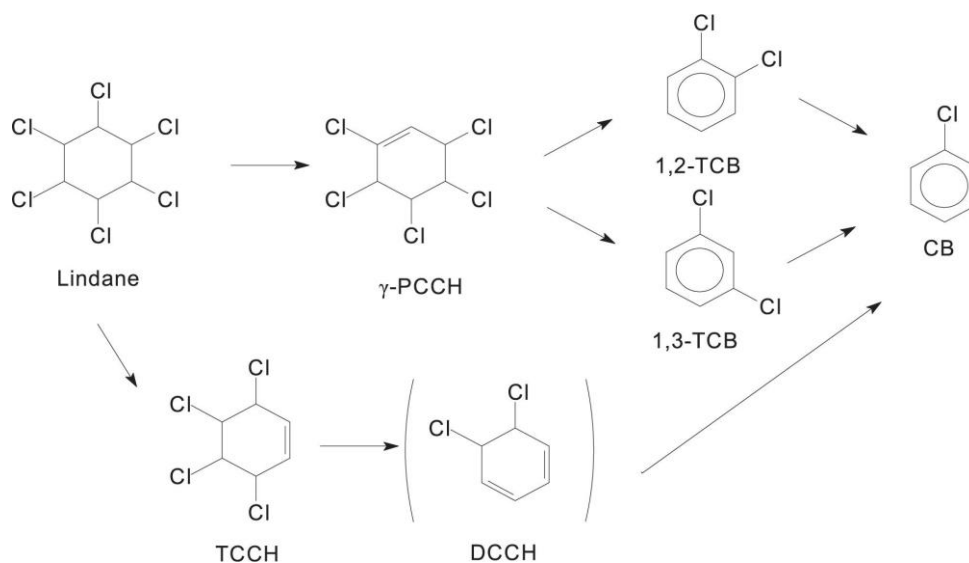
Hình 1.4. Các con đường phân hủy hiếu khí Lindane [132]

Ghi chú: pentachlorocyclohexane (PCCH), 2,4 trichlorobenzene (1,2,4-TCB), 2,5dichlorophenol (2,5-DCP), 2,5-dichlorohydroquinone (2,5-DCHQ), 1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene (1,4-TCDN), 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol (2,5-DDOL), chlorohydroquinone (CHQ), hydroquinone (HQ), axit tricarboxylic (TCA)

Một trong những con đường phân giải Lindane phổ biến nhất là quá trình khử chloride ban đầu, sau đó là quá trình oxy hóa để phá vỡ cấu trúc vòng. Con đường này được xúc tác bởi một loạt enzyme do các cụm gen *linABCDEFGHJ* mã hóa, thường được tìm thấy ở các vi khuẩn thuộc chi *Sphingobium* [32]. Các sản phẩm trung gian sau đó tiếp tục bị phân giải thông qua các con đường trao đổi chất cơ bản của vi sinh vật. Phản ứng khử halogen, cụ thể

là khử chloride trong các phân tử thuốc trừ sâu chứa clo hữu cơ như Lindane, đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân giải sinh học [32].

Con đường phân giải Lindane hiếu khí được nghiên cứu rất kỹ ở chủng vi khuẩn *Sphingobium japonicum* UT26 (Hình 1.4). UT26 có khả năng tận dụng và sử dụng γ -HCH làm nguồn cacbon và năng lượng cho bản thân [81]. So sánh về trình tự của các gen *lin* (đóng vai trò quan trọng trong việc phân giải Lindane) cho thấy: các chủng khác phân giải được Lindane và UT26 có trình tự các gen này gần như giống hoàn toàn; qua đó gợi ý rằng con đường phân giải Lindane ở các chủng này cũng sẽ tương tự như ở UT26 [81]. Trong con đường này, Lindane được chuyển hóa thành 2,4 trichlorobenzene (1,2,4-TCB), 2,5dichlorophenol (2,5-DCP) và 2,5-dichlorohydroquinone (2,5-DCHQ) bởi hoạt động của các enzyme dehydrochlorinase (LinA), halidohydrolase (LinB) và dehydrogenase (LinC). Sự phân giải Lindane thành 2,5-DCHQ được gọi là con đường ngược dòng, được tiếp nối bằng con đường xuôi dòng. 2,5-DCHQ được chuyển thành β -ketoadipate bằng dechlorinase khử (LinD), dioxygenase phân cắt vòng (LinE) và maleylacetate reductase (LinF). Các nhà nghiên cứu đã ghi nhận β -ketoadipate như một chất chuyển hóa đánh dấu sự phân hủy các hợp chất chứa vòng thơm. β -ketoadipate trung gian tiếp tục được chuyển thành succinyl-coenzyme A (CoA) và acetyl-CoA bởi succinyl-CoA: 3-oxoadipate CoA transferase (LinGH) và β -ketoadipyl CoA thiolase (LinJ). Cả hai hợp chất này đều được chuyển hóa trong chu trình axit tricarboxylic (TCA). Ngoài ra, các nghiên cứu khác báo cáo rằng Lindane có thể được chuyển hóa bởi vi sinh vật để tạo ra pentachlorocyclohexene (PCCH), 3,4,5,6-tetrachloro-cyclohexene (TCCH), pentachlorobenzene (PCB), hoặc trichlorobenzene (TCB) [50]. Các enzyme LinA, LinB, LinD, LinE xúc tác nhiều phản ứng, còn LinC chỉ xúc tác cho một phản ứng. Các gen *linA*, *linB*, *linC* nằm rải rác trên genome của UT26. Ngoài UT26, chủng *Sphingomonas paucimobilis* B90 được phân lập từ đất trồng lúa ở Ấn Độ cũng được phát hiện là phân hủy Lindane trong điều kiện hiếu khí [27]. Các gen *linA*, *linB*, *linC* tìm thấy ở *Sphingomonas paucimobilis* B90 có sự tương đồng với các gen *linA*, *linB*, *linC* ở *Sphingomonas paucimobilis* UT26.



Hình 1.5. Các con đường phân hủy kỵ khí Lindane [132]

Ghi chú: pentachlorocyclohexane (PCCH), tetrachlorocyclohexene (TCCH), 1,2,3-trichlorobenzene (1,2,3-TCB), 2,5-dichlorocyclohexanol (DCCH), chlorobenzene (CB)

Nhìn chung, con đường phân giải Lindane trong điều kiện kỵ khí khác và không phức tạp như con đường hiếu khí. Khác với con đường phân giải hiếu khí, các gen mã hóa và các enzyme tham gia vào con đường chuyển hóa kỵ khí đa phần đều chưa được biết đến [72]. Dù có những khác biệt như vậy, phản ứng khử chlorine/loại bỏ chlorine hóa đều là phản ứng thiết yếu trong cả hai con đường. Quintero và cộng sự (2006) đã nghiên cứu về khả năng phân giải bốn đồng phân HCH là α -HCH, β -HCH, γ -HCH và δ -HCH bằng vi sinh vật trong bioreactor kỵ khí. Các sản phẩm trung gian mà nhóm nghiên cứu phát hiện được gồm có: các đồng phân pentachlorocyclohexane (PCCH), tetrachlorocyclohexene (TCCH), 1,2,3-trichlorobenzene (1,2,3-TCB), 1,3-dichlorobenzene (1,3-DCB) và cuối cùng là chlorobenzene (CB). Cũng trong công trình này, nhóm tác giả nhận xét rằng các sản phẩm trung gian không được tích lũy và thường đi hết con đường phân giải để tạo thành chlorobenzene (CB). Một số các nghiên cứu khác, sử dụng các vi khuẩn *Clostridium* và *Bacillus*, lại ủng hộ giả thuyết cho rằng TCCH mới là sản phẩm trung gian trong con đường chuyển hóa kỵ khí Lindane [88]. Dựa vào cả hai quan điểm trên, có thể tạm thời thể hiện con đường phân giải lindane kỵ khí như ở Hình 1.5.

1.4.3 Các nghiên cứu về sử dụng tổ hợp chủng phân giải DDT và Lindane

DDT và Lindane là những chất có cấu trúc phức tạp, một đơn chủng nhiều khả năng sẽ không thể phân giải hiệu quả các chất này. Do vậy, cách tiếp cận phối hợp các đơn chủng để tạo thành tổ hợp chủng phân giải DDT hay Lindane là một giải pháp đầy hứa hẹn để khai thác hiệu quả hơn các nguồn gen vi sinh vật phân giải DDT và Lindane.

Trước đây, các vi sinh vật tiềm năng được biết đến tham gia vào quá trình phân hủy DDT và Lindane chủ yếu là đơn chủng vi khuẩn. Các ví dụ có thể kể đến như *Rhodococcus erythropolis* ET54b phân giải 32.3% Lindane 200 mg/L trong 5 ngày [132] hay *Bacillus cereus* phân giải 41–48% và 26–31% DDT ở nồng độ 50 mg/L và 200 mg/L tương ứng [49].

Trên thực tế, việc sử dụng các chế phẩm sinh học dựa trên một chủng vi sinh vật đã được nghiên cứu khá nhiều. Tuy nhiên, hiệu quả của các chế phẩm này khi đưa ra thực tế vẫn là một dấu hỏi lớn. Thêm nữa, do DDT và Lindane là những chất có cấu trúc phức tạp, một đơn chủng nhiều khả năng sẽ không thể phân giải hiệu quả chất này. Do vậy, cách tiếp cận phối hợp các đơn chủng để tạo thành tổ hợp chủng phân giải DDT và Lindane cũng đã được chú ý và nghiên cứu. Đến nay, các nghiên cứu đa phần về đối tượng là các tổ hợp chủng tự nhiên và đã thu được những kết quả nhất định. Đơn cử, Wang và các cộng sự (2020) đã báo cáo rằng quần xã vi sinh vật có sẵn trong đất sau khi được làm giàu có khả năng phân giải DDT tốt hơn các đơn chủng [116]. Một nghiên cứu khác đã phân lập và chọn lọc được 8 chủng với khả năng phân giải DDT tốt từ chất lắng công nghiệp có chứa DDT tại Mexico, kết quả cho thấy không có sự khác biệt trong hiệu quả phân giải DDT giữa tổ hợp 8 chủng và đơn chủng, nhưng chất chuyển hóa mới – không tìm thấy khi sử dụng đơn chủng - đã được phát hiện khi tổ hợp phân giải DDT [49]. Đối với Lindane, khả năng đồng xử lý Cr(VI) và Lindane cho thấy tổ hợp gồm 4 chủng *Streptomyces* sp. M7, MC1, A5 và *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 không có sự khác biệt so với đơn chủng *Streptomyces* sp. MC1, nhưng tổ hợp gồm 4 chủng đã giúp gia tăng thời gian sống sót của các chủng xạ khuẩn này trong điều kiện đất thực tế [15]. Điều này là vô cùng quan trọng do sự sinh trưởng của các vi sinh vật thường chịu nhiều ảnh hưởng bởi môi trường và có thể bị chết do các tác động tự nhiên dẫn đến không hoàn thành quá trình xử lý.

1.5 Genome-mining và ứng dụng trong nghiên cứu vi sinh vật – xử lý ô nhiễm môi trường

Sự phát triển nhanh chóng của công nghệ giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing – NGS) đã tạo ra bước tiến quan trọng trong nghiên cứu vi sinh vật. Trong đó, giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequencing – WGS) cho phép xác định gần như toàn bộ trình tự DNA của sinh vật, bao gồm nhiễm sắc thể và plasmid. Khác với các phương pháp sinh học phân tử truyền thống chỉ khảo sát một số lượng giới hạn gen đích, WGS cung cấp thông tin toàn diện về đặc điểm phân loại, tiến hóa, tổ chức hệ gen và tiềm năng chức năng của vi sinh vật. Nhờ đó, WGS đã trở thành nền tảng quan trọng cho các nghiên cứu về phân loại học, tiến hóa, dịch tễ học, sinh thái học và công nghệ sinh học, đồng thời mở ra hướng tiếp cận mới trong khai thác dữ liệu hệ gen (genome-mining)

Genome-mining được hiểu là quá trình khai thác và phân tích dữ liệu hệ gen nhằm dự đoán chức năng sinh học, các con đường chuyển hóa và tiềm năng ứng dụng của sinh vật thông qua các công cụ tin sinh học và cơ sở dữ liệu chuyên ngành [135]. Khác với phương pháp tuyển chọn truyền thống chủ yếu dựa trên các phép thử thực nghiệm, genome-mining cho phép nhận diện nhanh các gen chức năng, enzyme và mạng lưới trao đổi chất ngay từ dữ liệu trình tự hệ gen, từ đó định hướng lựa chọn các chủng vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng trước khi tiến hành xác nhận bằng thực nghiệm. Trên thế giới, phương pháp này ban đầu được sử dụng chủ yếu để khai thác các cụm gen tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp và phát hiện kháng sinh mới, sau đó được mở rộng sang nhiều lĩnh vực khác như enzyme công nghiệp, thúc đẩy sinh trưởng thực vật và xử lý môi trường. Tương tự như vậy, sau khi được phát triển, phương pháp genome-mining trong vi sinh vật học cũng chủ yếu tập trung vào việc dự đoán các hợp chất có hoạt tính sinh học sinh ra bởi vi sinh vật và con đường tổng hợp các chất này [134].

Trong lĩnh vực công nghệ sinh học môi trường, genome-mining đã được ứng dụng để nhận diện các gen và con đường chuyển hóa liên quan đến phân giải hydrocarbon, PAHs, PCB và thuốc bảo vệ thực vật chloride hữu cơ [137, 140, 151]. Cách tiếp cận này không chỉ giúp dự đoán khả năng phân giải của từng chủng mà còn cung cấp cơ sở để phân tích mạng lưới chuyển hóa và sự hỗ trợ chức năng giữa nhiều chủng vi sinh vật. Pan và cộng sự (2016)

đã kết hợp WGS, chú giải chức năng hệ gen và phân tích sản phẩm chuyển hóa để dự đoán con đường phân giải DDT ở *Stenotrophomonas* sp. DDT⁻¹ [84]. Tương tự, Jaiswal và cộng sự (2022) sử dụng KEGG để chú giải các gen *lin* (*linA*, *linB*, *linC*, *linD*, *linE* và *linX*), qua đó làm sáng tỏ con đường phân giải Lindane của *Paenibacillus dendritiformis* SJPS⁻⁴ [141]. Ngoài ra, hệ gen và cơ chế phân giải γ -HCH của *Sphingobium japonicum* UT26 cũng đã được nghiên cứu chi tiết và trở thành mô hình điển hình về phân giải Lindane [81]. Các nghiên cứu trên cho thấy genome-mining không chỉ hỗ trợ xác định các enzyme tham gia chuyển hóa mà còn góp phần làm sáng tỏ các con đường phân giải của các hợp chất ô nhiễm bền vững.

Để khai thác hiệu quả dữ liệu hệ gen, genome-mining thường kết hợp nhiều công cụ và cơ sở dữ liệu tin sinh học. Sau khi hệ gen được lắp ráp *de novo*, quá trình dự đoán và chú giải gen thường được thực hiện bằng phần mềm Prokka nhằm xác định các gen mã hóa protein và enzyme dựa trên các cơ sở dữ liệu tham chiếu. Các protein sau đó được phân loại theo nhóm chức năng COG thông qua EggNOG, giúp đánh giá sự phân bố các nhóm chức năng và nhận diện các gen tương đồng tiến hóa. Tiếp theo, các trình tự được ánh xạ lên các cơ sở dữ liệu trao đổi chất để dự đoán chức năng sinh học của chúng nghiên cứu. Hiện nay có nhiều cơ sở dữ liệu phục vụ chú giải chức năng như KEGG, MetaCyc, Reactome và CAZy. Trong đó, KEGG và MetaCyc là hai cơ sở dữ liệu toàn diện nhất về các con đường trao đổi chất, trong khi CAZy tập trung vào các enzyme hoạt động trên carbohydrate và Reactome chủ yếu phát triển cho một số sinh vật mô hình [122]. Đối với các nghiên cứu về phân giải các hợp chất ô nhiễm hữu cơ bền vững, KEGG được sử dụng phổ biến nhờ hệ thống KEGG Orthology (KO) và KEGG PATHWAY cho phép liên kết các gen với các enzyme và con đường chuyển hóa tương ứng. Đặc biệt, KEGG hiện là một trong số ít cơ sở dữ liệu chứa thông tin đầy đủ về các con đường phân giải DDT và Lindane, đồng thời cung cấp giao diện trực quan để xây dựng bản đồ chuyển hóa và phân tích khả năng trao đổi chất của từng chủng vi sinh vật [12]. Bên cạnh đó, cơ sở dữ liệu CAZy cũng được sử dụng rộng rãi để dự đoán các enzyme phân giải carbohydrate và nhiều enzyme đặc hiệu khác từ dữ liệu hệ gen [41, 68].

Mặc dù genome-mining đã được ứng dụng rộng rãi trong dự đoán chức năng gen và con đường chuyển hóa của vi sinh vật, các nghiên cứu khai thác dữ liệu hệ gen kết hợp cơ sở dữ liệu KEGG để dự đoán tương tác trao đổi chất giữa nhiều chủng, từ đó định hướng xây

dựng tổ hợp vi sinh vật xử lý DDT và Lindane, vẫn còn rất hạn chế. Đặc biệt, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào tiếp cận theo hướng này. Tại Việt Nam, ứng dụng genome-mining trong nghiên cứu vi sinh vật là vấn đề còn khá mới và chủ yếu phục vụ định danh hoặc dự đoán tiềm năng sinh tổng hợp chất có hoạt tính sinh học [149, 150]. Vì vậy, luận án lựa chọn genome-mining làm hướng tiếp cận để dự đoán sự hỗ trợ về trao đổi chất giữa các chủng, phục vụ xây dựng các tổ hợp vi sinh vật có hiệu quả xử lý cao DDT hoặc Lindane và khả năng thích nghi với điều kiện thực tế.

1.6 Các yếu tố thực tế ảnh hưởng đến các tổ hợp vi sinh vật có khả năng phân giải DDT và Lindane

Trong thực tế ứng dụng xử lý sinh học, sự phân hủy DDT và Lindane bởi tổ hợp vi sinh vật có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác nhau. Các tổ hợp có thể có khả năng thích nghi tốt hơn các chủng đơn lẻ trong những môi trường bất lợi, nhờ tương tác của chúng, ví dụ như loài này có khả năng xử lý chất chuyển hóa của loài khác trong tổ hợp. Chính tính đa dạng loài trong cùng một tổ hợp cho phép tổ hợp đó có tính linh hoạt cao trong môi trường sống, duy trì chức năng trong nhiều điều kiện khác nhau. Vì vậy, trong thực tế nghiên cứu, rất cần tìm hiểu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường như pH, nhiệt độ, nồng độ cơ chất hay các yếu tố khác như nguồn cacbon, nitơ, dịch vi lượng hay tỷ lệ tiếp giống tới khả năng tồn tại và hiệu quả xử lý ô nhiễm của các tổ hợp chủng, để đánh giá được sự khác biệt mà tương tác vi sinh vật trong mỗi tổ hợp mang lại.

Ảnh hưởng của nhiệt độ: Nhiệt độ ảnh hưởng đến quá trình phân hủy sinh học DDT và Lindane thông qua ảnh hưởng đến bản chất vật lý - hóa học và tốc độ chuyển hóa hydrocacbon bởi vi sinh vật cũng như thành phần của tổ hợp vi sinh vật. Nhìn chung, khoảng nhiệt độ tối ưu cho quá trình phân hủy các đồng phân Lindane nằm trong khoảng 25–30 °C do đây là khoảng nhiệt độ thúc đẩy mạnh mẽ hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật và làm giảm sự hấp phụ của Lindane lên pha rắn [88]). Kết quả tương tự được Benimeli và cộng sự ghi nhận khi chủng *Streptomyces* sp. M7 loại bỏ Lindane hiệu quả nhất ở 30°C [20]. Tuy nhiên, một số chủng *Sphingobium* vẫn có khả năng thích nghi và phân giải Lindane ở nhiệt độ thấp tới 4°C [133]. Trong khi đó, đối với DDT, khả năng phân giải thường được quan sát là giảm khi nhiệt độ giảm; điều này được cho là kết quả chủ yếu của việc giảm tốc độ hoạt

động của enzyme. Nhiệt độ cao hơn làm tăng tốc độ chuyển hóa hydrocacbon đến mức tối đa, điển hình là trong khoảng 30 đến 40°C; trên mức đó thì độc tính màng tế bào của hydrocacbon tăng lên. Theo Pan và cộng sự (2016), sự phân giải DDT do nuôi cấy vi khuẩn ở 35°C là 0,034 mg/l/ngày trong khi sự phân hủy sinh học ở 15°C là 0,022 mg/l/ngày [84]. Tuy nhiên, ở mức nhiệt độ cao (>70°C), do liên quan đến sự giảm khả năng hòa tan oxy, hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật hiếu khí đã giảm. Hơn nữa, ở một mức độ nhất định, phạm vi nhiệt độ sẽ xác định các loại vi sinh vật chiếm ưu thế và hoạt động enzyme của chúng để đảm bảo quá trình phân giải.

Ảnh hưởng của pH: Các kết quả nghiên cứu đã cho thấy pH là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến sự phân hủy DDT và Lindane. Theo Hua Fang và cộng sự (2010), thời gian bán phân hủy của p,p' - DDT, o,p' - DDT, p,p' - DDD và p,p' - DDE ở pH 7,0 ngắn hơn đáng kể về mặt thống kê ($p \leq 0,05$) so với thời gian bán hủy ở pH 5,0 và 9,0. Kết quả chỉ ra rằng điều kiện trung tính thuận lợi cho sự phân hủy DDT của chủng *Sphingobacterium* sp, trong khi pH cao hơn hoặc thấp hơn sẽ ức chế sự phân giải [46]. Bidlan và Manonmani cũng báo cáo rằng độ pH gần trung tính là thuận lợi nhất cho sự phân hủy DDT bởi *S. marcescens* DT-1P trong môi trường khoáng cơ bản [28]. Tương tự vậy, Elcey và Kunhi (2010) báo cáo rằng một quần thể vi sinh vật đã được thích nghi có thể phân giải Lindane ở khoảng pH từ 3 đến 9 nhưng tối ưu nhất là từ 6 đến 8 [45]. Một nghiên cứu khác bởi Murthy và Manonmani (2007) với một tổ hợp 10 loài vi sinh vật cho thấy không có sự phân giải Lindane nào diễn ra ở pH 4 và khi tăng dần pH về mức trung tính thì có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sống sót của các chủng thành phần [79]. Điều này cho thấy pH môi trường có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tồn tại của các thành phần trong tổ hợp.

Ảnh hưởng của nồng độ chất ô nhiễm: Nồng độ của DDT và Lindane cũng có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động của vi sinh vật vì nồng độ cao sẽ dẫn đến tình trạng gây độc hoặc ức chế. Trong khi đó, nồng độ quá thấp có thể chưa đủ để cảm ứng hoạt động cho các enzyme phân giải [18]. Theo Xiong Pan và cộng sự (2016), tốc độ mà *Stenotrophomonas* sp. DDT⁻¹ phân hủy DDT ở ba nồng độ 0,1, 1,0 và 10,0 mg/L lần lượt là 0,004, 0,038 và 0,086 mg/L/ngày [84]. Một báo cáo cho thấy hỗn hợp chủng gồm *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., và *Flavobacterium* sp. có tốc độ phân giải DDT giảm khi tăng nồng độ

DDT từ 50 lên 500 mg/L sau 1 tháng [103]. Theo Pesce và Wunderlin (2004) cho thấy một quần thể vi khuẩn làm tăng tốc độ phân hủy Lindane khi tăng dần nồng độ Lindane, tuy nhiên khi tăng từ 0,069 lên 0,412 mM thì hiệu suất phân hủy sinh học lại giảm từ 100% xuống còn 83,3% [87].

Bên cạnh các yếu tố trên, các yếu tố quan trọng khác như nguồn cacbon, nitơ và vi lượng (ngoài chất ô nhiễm sẵn có trong môi trường) trong môi trường cũng ảnh hưởng rất lớn đến khả năng phân giải chất ô nhiễm. Trong quá trình phân hủy DDT hay Lindane, vi sinh vật thường sử dụng các chất này làm nguồn năng lượng chính (dưới dạng nguồn cacbon, nitơ, ...).

Ảnh hưởng của nguồn cacbon bổ sung: Các nguồn cacbon mà vi sinh vật sử dụng đóng vai trò là cơ chất của mạng lưới trao đổi chất, trong đó chúng được phân giải để cung cấp các nguyên liệu để tạo nên các cấu trúc trong tế bào vi sinh vật. Tuy nhiên, khi bổ sung hai nguồn đều thuộc một nhóm, vi khuẩn thường có xu hướng sử dụng nguồn ưu tiên (có tốc độ sinh trưởng cao hơn) trước [120]. Các nguồn bổ sung này không phải lúc nào cũng kích thích sự phân giải mà trong một số trường hợp làm hạn chế quá trình phân giải [89]. Đơn cử, trong nghiên cứu của Wang và cộng sự năm 2023, tốc độ phân hủy DDT của *A. globiformis* DC-1 đạt gần 80% sau 24 giờ ở mẫu không bổ sung nguồn cacbon [118]. Sau khi bổ sung glucose, sucrose và fructose, sự phân hủy sinh học DDT của *A. globiformis* DC-1 bị ức chế đáng kể, tốc độ phân giải chỉ đạt 50,6 - 63,9%. Trong khi đó, Benimeli và cộng sự (2007) báo cáo chủng *Streptomyces* sp. M7, khi có sự xuất hiện của glucose, không những tăng sinh khối mạnh mà còn kích thích mạnh mẽ quá trình phân giải Lindane [21].

Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung: Nguồn nitơ có thể được sử dụng từ nhiều dạng khác nhau, dẫn đến ảnh hưởng khác nhau của các nguồn nitơ lên các loại vi sinh vật khác nhau, đặc biệt là trong những tổ hợp đa dạng vi sinh vật. Ví dụ, trong số các nguồn nitơ khác nhau, amoni là nguồn nitơ được ưa thích, hỗ trợ tăng trưởng nhanh, trong khi các nguồn nitơ thay thế khác, chẳng hạn như một số axit amin, lại được coi là nguồn nitơ kém, khó hỗ trợ tăng trưởng cho vi sinh vật hơn nhiều. Một số nghiên cứu cho thấy, việc bổ sung một số nguồn nitơ vào môi trường không chỉ giúp tăng cường hoạt động của vi sinh vật trong đất mà còn giúp ổn định độ pH của đất [117]. Tuy nhiên, Guillén-Jiménez và cộng sự (2012) khi đánh

giá ảnh hưởng của hàm lượng nitơ và phospho đến quá trình phân hủy sinh học Lindane bởi *Fusarium verticillioides* AT-100, đã nhận thấy hàm lượng nitơ và photpho hạn chế và sự không bổ sung chất hoạt động bề mặt sẽ thúc đẩy quá trình phân hủy Lindane [138].

Ảnh hưởng của nguồn các chất vi lượng: Nhiều nguyên tố khoáng không thể thiếu trong quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Mỗi vi khuẩn có nhu cầu dinh dưỡng riêng tùy thuộc vào các chất chuyển hóa mà nó có khả năng tự tạo ra. Hầu hết các vi khuẩn đều khá linh hoạt, có nghĩa là chúng có thể tìm cách phát triển trong nhiều điều kiện dinh dưỡng khác nhau. Tuy nhiên, thiếu hụt chất dinh dưỡng là một yếu tố giới hạn nghiêm trọng đối với sự phát triển của vi sinh vật và khả năng duy trì quần xã [101]. Một báo cáo về việc bổ sung các nguyên tố vi lượng như $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , NaCl , MnSO_4 , FeSO_4 cũng giúp hỗ trợ phân hủy DDT lên đến 80% sau 18 ngày [95].

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống: Tỷ lệ sinh khối vi sinh vật đưa vào môi trường khi xử lý ô nhiễm cũng rất quan trọng, vì tỷ lệ không phù hợp có thể cản trở hoặc ức chế hoạt động của vi sinh vật và khả năng phân hủy sinh học. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc sử dụng tiếp giống lớn hơn có thể làm tăng hiệu suất phân hủy Lindane [138]. Tuy nhiên, mặc dù sự trao đổi chất của vi sinh vật có thể tạm thời tăng lên khi sử dụng một tỷ lệ pha trộn nhất định, sự ức chế lâu dài đối với các vi sinh vật quan trọng về mặt chức năng có thể dẫn đến thất bại trong quá trình xử lý sinh học [101]. Trong một nghiên cứu khác, việc tăng lượng giống ban đầu của chủng *Candida* sp. VITJzN04 từ 0,02 lên 0,06 mg/L đã giúp tăng hiệu quả xử lý Lindane từ 40 lên 100% cùng một thời gian nhưng khi tăng tiếp lượng giống vượt mức thì ảnh hưởng không còn đáng kể [10]. Hơn nữa, việc xác định số lượng vi sinh vật tối thiểu có thể hỗ trợ và duy trì hoạt động phân giải mong muốn có liên quan trực tiếp đến tính kinh tế của quá trình xử lý sinh học [101].

1.7 Chế phẩm sinh học xử lý ô nhiễm DDT và Lindane trong đất

1.7.1 Chế phẩm sinh học phân hủy thuốc BVTV

Vi sinh vật phân hủy hóa chất BVTV thường theo cơ chế sử dụng các chất này làm nguồn năng lượng chính hoặc tổng hợp các enzyme phân hủy chất ô nhiễm thành các hợp chất đơn giản và có độc tính ít hơn [37]. Do đó, chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ vi sinh

vật đang được nghiên cứu và ứng dụng nhiều hiện nay. Kết quả lý tưởng nhất là sự khoáng hóa, phân hủy hoàn toàn thuốc BVTV thành H_2O và CO_2 mà không tích tụ các chất trung gian độc hại [61]. Các sản phẩm phân hủy có độ an toàn cao, mang tính bền vững (không độc hại, thân thiện đối với sức khỏe con người, hệ sinh thái và không ảnh hưởng xấu đến hệ vi sinh vật đất) là một lựa chọn hiệu quả và rẻ tiền để xử lý ô nhiễm thuốc BVTV. Tuy nhiên, hiệu quả phân hủy thuốc BVTV bằng chế phẩm sinh học phụ thuộc nhiều yếu tố như:

Đặc điểm hóa học của thuốc BVTV: Tốc độ phân hủy sinh học phụ thuộc vào thành phần của từng loại thuốc BVTV vì mỗi loại thuốc BVTV có tính chất vật lý, hóa học khác nhau. Khả năng xử lý thuốc BVTV phụ thuộc vào cấu trúc, trọng lượng phân tử cũng như nhóm chất hóa học. Các chất có cấu trúc phức tạp sẽ khó bị phân hủy sinh học hơn [94].

Quần xã vi sinh vật tại chỗ: Tốc độ phân hủy chất ô nhiễm phụ thuộc vào sự có mặt của vi khuẩn trong khu vực bị ô nhiễm, thông thường là vi sinh vật tại chỗ. Khả năng phân hủy sinh học bị ảnh hưởng bởi mật độ vi sinh vật, sự tương tác giữa các vi sinh vật và sự phân bố của chúng. Khả năng sản xuất enzyme của vi sinh vật cũng ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ phân hủy của thuốc BVTV ở các khu vực bị ô nhiễm [94].

Yếu tố môi trường: Các yếu tố khác nhau như pH, độ ẩm, nhiệt độ, tính chất của đất, nguồn dinh dưỡng được xây dựng để xử lý thuốc BVTV trong các điều kiện khác nhau. Vi sinh vật cần những điều kiện sinh trưởng, tồn tại và hoạt động trao đổi chất khác nhau. Việc tăng tính khả dụng sinh học của chế phẩm bằng cách bổ sung chất hoạt động bề mặt tự nhiên nhằm giúp vi sinh vật dễ tiếp cận chất ô nhiễm cũng là một yếu tố rất quan trọng.

1.7.2 Tình hình nghiên cứu chế phẩm xử lý tồn dư DDT và Lindane

Đối với các chế phẩm xử lý DDT: Năm 2010, Yuechun và các cộng sự đã sử dụng chế phẩm dịch chiết xuất enzyme laccase từ nấm mục trắng để xử lý sinh học đất nhiễm DDT và đạt hiệu suất phân giải 69% sau 25 ngày [127]. Việc kết hợp nhiều chủng vi sinh vật cũng thể hiện khả năng xử lý đất ô nhiễm DDT hiệu quả trong thực tế, thể hiện qua tác hiệu quả phân giải đến 65% của một số chế phẩm sử dụng hỗn hợp chủng như Daramend® và BioSite® [73]. Năm 2003, Sasek và các cộng sự đã dùng hỗn hợp chủng Xenorem® để ủ phân trộn lên đất ô nhiễm DDT ở sông Savannah, kết quả thu được hiệu quả phân giải lên đến 95% [100]. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu chế phẩm sinh học phân hủy DDT vẫn còn hạn chế,

điều này cho thấy việc nghiên cứu sản xuất chế phẩm xử lý hiệu quả ô nhiễm DDT tồn dư trong đất là một hướng đi triển vọng.

Đối với các chế phẩm xử lý Lindane: Năm 2014, Juliana M.Saez cùng các cộng sự đã nghiên cứu xử lý Lindane khỏi bùn đất bằng dịch nuôi cấy từ chủng vi sinh vật *Streptomyces* cố định trong túi vải với hiệu quả phân giải 70% [97]. Năm 2021, Zeba Usmani và các cộng sự đã sử dụng sinh khối vi khuẩn từ các chủng vi khuẩn *Actinobacteria* để xử lý đất ô nhiễm Lindane với hiệu quả phân giải 70% sau 30 ngày ủ [111]. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu về chế phẩm sinh học xử lý Lindane với thời gian sử dụng lâu dài vẫn còn hạn chế, vậy nên việc nghiên cứu nhằm sản xuất chế phẩm xử lý hiệu quả ô nhiễm Lindane tồn dư trong đất được đánh giá là một hướng nghiên cứu cần được quan tâm thêm.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về việc tìm kiếm và ứng dụng vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ khó phân hủy như DDT và Lindane vẫn còn hạn chế. Như trên đã nêu, mới chỉ có một công bố về chủng nấm sợi FNA1 có khả năng phân hủy DDT với hiệu quả cao [1] và một công bố khác về chủng nấm sợi FNA33 có khả năng phân hủy Lindane hiệu quả [3]. Thực tế này cho thấy vẫn còn một khoảng trống nghiên cứu đáng kể, đồng thời mở ra triển vọng cho việc phát triển các hướng nghiên cứu mới nhằm tạo ra các chế phẩm vi sinh – đặc biệt là chế phẩm sinh học đa chủng từ vi khuẩn và xạ khuẩn – có khả năng xử lý hiệu quả ô nhiễm DDT và Lindane tồn dư trong đất tại Việt Nam.

1.7.3 Sản xuất chế phẩm sinh học

Việc nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học vi sinh vật nhằm xử lý ô nhiễm tồn dư thuốc BVTV trong đất là một hướng đi mới, hứa hẹn khả năng xử lý tại chỗ cũng như xử lý triệt để chất ô nhiễm với chi phí hợp lý. Vì vậy, xây dựng được quy trình sản xuất chế phẩm sinh học là rất quan trọng trong quá trình đưa nghiên cứu từ phòng thí nghiệm đến áp dụng trong thực tế. Trong đó, các khâu lên men, thu hồi sinh khối, bảo quản và hoàn thiện chế phẩm là rất quan trọng cần được quan tâm nghiên cứu.

1.7.3.1 Lên men thu sinh khối vi khuẩn

Lên men được hiểu là quá trình chuyển hóa cơ chất của vi sinh vật, từ đó làm tăng sinh khối và tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất có hoạt tính sinh học [83]. Do đây là một bước

quan trọng, trong nghiên cứu nhằm sản xuất chế phẩm sinh học, cần đánh giá ảnh hưởng của nhiều yếu tố đến quy trình lên men thu sinh khối vi sinh vật.

Để quá trình lên men đạt hiệu quả tối ưu, môi trường nuôi cấy cần cung cấp đầy đủ các dưỡng chất thiết yếu cho sự sinh trưởng, phát triển và khả năng tạo sản phẩm của vi sinh vật. Các thành phần cơ bản trong môi trường lên men thường bao gồm nguồn cacbon, nitơ và các nguyên tố vi lượng.

Tỷ lệ tiếp giống: Tỷ lệ bổ sung vi khuẩn cho vào môi trường ảnh hưởng rất lớn đến quá trình lên men. Việc cung cấp vi khuẩn thích hợp thì quá trình lên men diễn ra tốt và hiệu suất thu hồi cao. Theo Irfan và cộng sự (2016), khi tăng lượng giống từ mức thấp giúp làm tăng sản lượng enzyme đến một giá trị tối ưu. Tuy nhiên, khi vượt quá ngưỡng tối ưu (khoảng 1,5–2%), hiệu suất xylanase giảm do sự cạn kiệt dinh dưỡng trong môi trường lên men [59].

Nguồn cacbon: Nguồn cacbon cần được xác định ngay từ giai đoạn đầu của quá trình lên men vì nó ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật, qua đó ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất sản xuất sản phẩm. Chất thải thực phẩm như rỉ đường hoặc chất thải chăn nuôi được coi là nguồn cơ chất dạng thô ít tốn kém, có nguồn cung dồi dào đồng thời đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng cho vi sinh vật [65].

Nguồn nitơ: Ngoài cacbon thì nitơ đóng vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp các axit amin, thành phần cấu tạo nên protein, purines and pyrimindines – cơ sở cấu thành DNA và RNA, và cho các phân tử khác như glucosamine. Các nguồn nitơ thường được sử dụng khi lên men gồm có các nguồn vô cơ như (amonin, muối nitrate) và các nguồn hữu cơ như acid amin (pepton, nước mắm, cao nấm men, ...).

1.7.3.2 Thu hồi và bảo quản sinh khối vi khuẩn sau lên men

Việc thu nhận sinh khối vi khuẩn sau lên men với hiệu suất cao có ý nghĩa quyết định đối với tính kinh tế của một phương pháp thu hồi. Thu hồi sản phẩm sau lên men thường bắt đầu bằng cách tách sinh khối vi sinh vật khỏi dịch nuôi bằng phương pháp như ly tâm, lọc... Việc thu hồi sản phẩm lên men rất phức tạp, mỗi loại hình yêu cầu những phương pháp tách, tinh sạch sản phẩm riêng biệt. Mỗi loại vi sinh vật được lên men sẽ phù hợp với các phương pháp thu hồi khác nhau. Ví dụ, trong nghiên cứu của của Prabakaran và Hoti, phương pháp lọc

có hiệu suất cao hơn so với phương pháp ly tâm, thể hiện qua lượng sinh khối *Bacillus thuringiensis* thu được từ phương pháp lọc là 53,3 g/L, so với ly tâm là 39,0 g/L [90]. Vì vậy, việc lựa chọn phương pháp thu hồi sinh khối hiệu quả và kinh tế là vấn đề rất quan trọng.

Việc sử dụng chất mang để bảo quản sinh khối vi sinh vật cũng là một khâu quan trọng. Theo Smith (1992), hai đặc tính cần thiết ở chất mang phải là hỗ trợ sự phát triển của vi sinh vật và duy trì các quần thể vi sinh trong chế phẩm trong một khoảng thời gian mong muốn. Để đạt được những mục tiêu này, chất mang phải có khả năng giữ nước cao, thể hiện tính đồng nhất về mặt hóa học và vật lý, đồng thời không độc đối với các chủng trong chế phẩm cũng như an toàn với môi trường [148]. Thông qua đánh giá hiệu quả bảo quản của một số vật liệu ứng dụng làm chất mang như than bùn sinh học, khoáng sét...., đã cho thấy chúng đều có khả năng phân hủy sinh học, độc tính thấp, quy trình chuẩn bị đơn giản, phổ biến và chi phí khá thấp [128]. Một số chất mang thường được sử dụng để bảo quản vi sinh vật như than bùn, than củi, bột talc, cám gạo, bã mía, phân hữu cơ hay chất mang có nguồn gốc từ tro rơm với thành phần gồm 60% cacbon và 35%SiO₂ [53]. Ở Việt Nam, than bùn là chất mang được sử dụng khá nhiều để bảo quản vi sinh vật, bên cạnh đó còn một số chất mang khác như cám gạo, tinh bột sắn, phân hữu cơ cũng đã được nghiên cứu ứng dụng khá nhiều [7]. Đây đều là những vật liệu có số lượng lớn, giá thành rẻ, thích hợp để sử dụng làm chất mang để sản xuất chế phẩm sinh học. Bên cạnh tác dụng của vi sinh vật, hiệu quả xử lý của chế phẩm có lẽ cũng nhờ công thức chế phẩm phù hợp. Theo Nguyễn Thị Hằng Nga và cộng sự (2016), tỷ lệ khối lượng vi sinh vật : chất mang = 1:10 đã được chứng minh là tối ưu cho nhiều loại chế phẩm [6].

Hiện chưa có nghiên cứu về các chất mang trong chế phẩm sinh học nhằm xử lý ô nhiễm DDT và Lindane tồn dư trong đất. Do đó, đây là một thách thức trong việc sản xuất chế phẩm sinh học xử lý ô nhiễm thuốc BVTV nói chung và DDT hay Lindane nói riêng nhằm cải tạo môi trường đất nông nghiệp.

1.7.3.3 Ảnh hưởng của các điều kiện thực tế đến hiệu quả phân giải chất ô nhiễm của chế phẩm sinh học khi được đưa vào đất

Đất là một hệ thống rất phức tạp bao gồm nhiều vật chất khác nhau với các đặc tính vật lý, hóa học và sinh học khác nhau. Khả năng sinh trưởng, hoạt tính của chế phẩm vi sinh bổ sung vào đất dễ bị ảnh hưởng bởi các thay đổi về tính chất vật lý cấu trúc đất, tính chất hóa học, hàm lượng chất dinh dưỡng và sự có mặt của các vi sinh vật có sẵn trong môi trường xung quanh. Do đó, các kết quả ngoài thực địa có thể sai khác lớn so với kết quả thí nghiệm trong phòng thí nghiệm. Những điều kiện đặc thù và thay đổi liên tục của môi trường có thể gây căng thẳng sinh học cho vi khuẩn, gây ức chế sự phát triển và hoạt tính của chúng [96].

Hàm lượng nước và nhiệt độ đất: Tùy theo chu kỳ thời gian trong năm, nhiệt độ, lượng mưa, độ ẩm có thể thay đổi, ảnh hưởng trực tiếp đến các quá trình sinh học của vi khuẩn đưa vào đất. Như đã trình bày ở trên, hàm lượng nước và nhiệt độ biến thiên ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng của vi khuẩn. Đây là hai yếu tố gắn liền với nhau, đồng thời cũng ảnh hưởng gián tiếp đến độ pH và hàm lượng dinh dưỡng trong đất [96]. Đặc biệt, độ ẩm là một yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến sinh trưởng của vi sinh vật. Mọi loại vi sinh vật đều sinh trưởng trong một giới hạn độ ẩm nhất định, từ đó ảnh hưởng đến khả năng phân giải DDT và Lindane của vi sinh vật. Ví dụ, trong thí nghiệm của Bumpus và cộng sự, *Phanerochaete chrysosporium* đã được sử dụng để hỗ trợ quá trình khoáng hóa DDT. Ảnh hưởng của độ ẩm được xác định bằng cách thay đổi độ ẩm 20, 40, 50, 80 và 90%, các kết quả cho thấy rằng độ ẩm khoảng 40% là tối ưu [31]. Trong một nghiên cứu khác, Boul đã phát hiện dư lượng DDT giảm mạnh hơn trong các cánh đồng có tưới nước so với các cánh đồng không được tưới nước [29]. Sự sụt giảm DDT này có thể do sự gia tăng độ ẩm trung bình của đất [29].

Tương tác với vi sinh vật tại chỗ: Đất là nơi sinh sống của một hệ sinh thái rộng lớn của các sinh vật đất. Vì vậy, việc bổ sung chế phẩm sinh học vào đất sẽ có những ảnh hưởng không thể đoán trước được. Khi tỷ lệ bổ sung chế phẩm vào đất khá thấp, vi khuẩn được bổ sung cần sinh trưởng, phát triển, cạnh tranh với lượng lớn vi sinh vật tại chỗ. Đây có thể là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp ảnh hưởng đến hoạt tính của chế phẩm sinh học

Khả năng tiếp cận chất ô nhiễm của vi sinh vật: Trở ngại lớn đối với phân hủy sinh học DDT và Lindane là khả năng tiếp cận kém của vi sinh vật tới các chất ô nhiễm do tính kỵ nước của các chất này. Vì vậy, việc bổ sung chất hoạt động bề mặt nhằm giúp vi sinh vật dễ dàng tiếp cận chất ô nhiễm là vấn đề quan trọng. Trong nghiên cứu của Betancur và cộng sự (2015), việc bổ sung 6,55 mg/kg Tween 80 vào quần thể vi sinh vật tự nhiên trong đất làm giảm 94,3% DDT từ nồng độ ban đầu 99,46 ppm sau 8 tuần. Trong trường hợp không bổ sung Tween 80, lượng DDT chỉ giảm 4,28% [23]. Nghiên cứu của Wang và cộng sự (2018) thì cho thấy, việc sử dụng *Arthrobacter globiformis* bổ sung 5mg/kg Rhamnolipis làm giảm 64,3% dư lượng DDT sau 150 ngày, cao hơn 12,2% so với khi không bổ sung chất hoạt động bề mặt này [119]. Bên cạnh đó, cũng có nhiều nghiên cứu đã công bố rằng sự bổ sung Tween 80 có thể tạo điều kiện cho sự hòa tan và phân hủy Lindane trong đất và nước. Theo Saez và cộng sự (2015), việc bổ sung 1-1,25mM Tween 80 giúp hòa tan Lindane tốt trong nước với nồng độ 50-100 mg/L, từ đó giúp vi sinh vật dễ dàng tiếp cận và phân hủy Lindane với hiệu quả lên đến 97% [99].

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu nghiên cứu

2.1.1 Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm GREENLAB - Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Sự sống và phòng thí nghiệm Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ cơ bản cần thiết: máy vortex IKA vortex3 (Đức), máy quang phổ ELISA microplate reader Plus384 (Hoa Kỳ), máy ly tâm Eppendorf 5424R (Đức), micropipette (Đức), hệ GC-FID 7890B (Agilent), hệ GS-MS 5977C GC/MSD (Agilent),...

Các thiết bị, dụng cụ dùng cho các thí nghiệm sinh học phân tử: máy PCR 9700 (Applied Biosystems, Mỹ), máy ly tâm 5417R (Eppendorf, Đức), máy điện di ngang (BioRad, Mỹ), bàn soi gel LMW-20 UVP (UK), máy đo OD (LaboMed, Hoa Kỳ)

Các thiết bị, dụng cụ dùng cho các nghiên cứu lên men và thu hồi sinh khối: hệ thống lên men 10 lít Bioflo 120 (Eppendorf, Đức), máy lắc ổn nhiệt ES-20/60 (Đức), nồi khử trùng SH-AC-128L (Hàn Quốc), máy ly tâm Eppendorf 5424R (Đức), hệ thống lọc tiếp tuyến GE HealthCare (Hoa Kỳ), máy đông khô FDTA-5025 (Hàn Quốc), máy vortex IKA-3 (Đức), máy đo OD (LaboMed, Hoa Kỳ), micropipet (Đức),...

Các thiết bị khác: Máy tính và phần mềm Excel phục vụ cho ghi chép, lưu trữ và xử lý số liệu từ máy đo tự động

Hóa chất: Các hóa chất đều đảm bảo chất lượng và được mua từ các hãng uy tín như Sigma-Aldrich, Merk, Xilong... bao gồm:

- + Chất chuẩn: 4,4'-DDT 99,8% (Dr. Ehrenstorfer, Đức), Lindane 99.8% (Sigma, Đức)
- + Hóa chất nuôi cấy vi sinh vật: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , CaSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, peptone, tinh bột tan, cao nấm men.

+ Hóa chất để pha dung dịch vi lượng: ZnCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaMO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 .

+ Hóa chất sử dụng để xác định đặc tính sinh học của vi sinh vật: fructose, galactose, maltose, lactose, sucrose, phenol, ammonium citrate, glycine, KNO_3 .

+ Bộ kit tách DNA bao gồm: DNeasy® Blood & Tissue và DNeasy® PowerSoil Pro Kits. (Qiagen, Đức).

+ Hóa chất để tách chiết DDT và Lindane: chloroform, n-hexane.

+ Các chất mang được thử nghiệm: xỉ than và than bùn (loại 1: chỉ tiêu kỹ thuật: hàm lượng hữu cơ: 30-35%, màu đen than, độ mịn: qua sàng 3,5 mm, độ ẩm: 20-30%) được cung cấp bởi Xưởng than Trường Thủy, xã An Khánh, (Hà Nội, Việt Nam); tinh bột sắn và cám gạo được mua ở dạng thương phẩm phổ biến trên thị trường (Hà Nội, Việt Nam).

+ Đất sử dụng cho thí nghiệm đánh giá khả năng phân giải DDT và Lindane trong đất của các chế phẩm được lấy từ xã Nam Phù, TP. Hà Nội (20°55'29.5"N 105°52'42.2"E).

2.1.2 Môi trường

Các dung dịch stock DDT và Lindane: dung dịch stock DDT hoặc Lindane nồng độ 1000 ppm (1000 mg/L) được chuẩn bị trong acetone (thường là 100 mg DDT hoặc Lindane pha vào 100 mL acetone).

Dung dịch vi lượng được chuẩn bị với thành phần như sau: 1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,07g ZnCl_2 ; 0,1g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,006g H_3BO_3 ; 0,13g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,002g $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,024g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,036g $\text{NaMO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,238 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0-7,2

Các môi trường LB, YS, ISP2, MSM và MSM bổ sung rỉ đường (MSM – rỉ đường) (công thức cụ thể ở Bảng 2.1) được sử dụng trong nghiên cứu này để nuôi cấy vi khuẩn và xạ khuẩn trong các thí nghiệm khác nhau. Sau pha trộn, các môi trường được khử trùng ở 121°C trong 15 phút, riêng môi trường MSM-rỉ đường được khử trùng 101°C trong 20 phút trước khi sử dụng.

Bảng 2.1. Các loại môi trường và thành phần sử dụng trong nghiên cứu

Tên môi trường	Thành phần (cho 1 L môi trường)
Môi trường Luria-Bertani (LB)	10g peptone, 5g cao nấm men, 10g NaCl, pH 7,0-7,2, bổ sung 16g thạch nếu làm môi trường thạch
Môi trường Yeast-Starch (YS)	10g tinh bột tan, 2g cao nấm men, pH 7,0-7,2, bổ sung 16g thạch nếu làm môi trường thạch
Môi trường ISP2	4g cao men, 10g cao malt, 4g glucose, pH 7,0-7,2; bổ sung 16g thạch nếu làm môi trường thạch
Môi trường muối khoáng Mineral Salts Medium (MSM)	0,4g $MgSO_4.7H_2O$; 0,002g $FeSO_4.7H_2O$; 0,2g K_2HPO_4 ; 0,2g $(NH_4)_2SO_4$; 0,08g $CaSO_4$; 0,1% vi lượng; pH 7,0-7,2, bổ sung 16g thạch nếu làm môi trường thạch
Môi trường lên men thu sinh khối: MSM – rỉ đường	10g rỉ đường, 1g $NH_4(SO_4)_2$, 0,4g $MgSO_4.7H_2O$; 0,002g $FeSO_4.7H_2O$; 0,2g K_2HPO_4 ; 0,2g $(NH_4)_2SO_4$; 0,08g $CaSO_4$; 0,1% vi lượng; pH 7,0-7,2.

Các môi trường nêu trên, nếu chứa DDT hoặc Lindane, thì được bổ sung dung dịch stock DDT hoặc Lindane tương ứng (nồng độ 1000 ppm) sau khi khử trùng với lượng phù hợp để đạt được nồng độ DDT hoặc Lindane cần thử nghiệm.

2.1.3 Đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, 19 chủng vi sinh vật có tiềm năng phân giải DDT hoặc Lindane tốt (Bảng 2.2) được lựa chọn để phân tích hệ gen, dự đoán chức năng bằng phương pháp genome-mining và xây dựng các tổ hợp vi sinh vật. Các chủng vi sinh vật này thuộc bộ sưu tập chủng của phòng thí nghiệm GREENLAB – Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Sự sống được phân lập tại Việt Nam. Các chủng được phân lập từ các mẫu đất ô nhiễm thuốc bảo vệ thực vật tại nhiều địa phương ở Việt Nam và đã được tuyển chọn qua các nghiên cứu trước đây dựa trên khả năng sinh trưởng và phân giải DDT hoặc Lindane trong điều kiện phòng thí nghiệm [2, 9, 115] của nhóm nghiên cứu và được kí gửi (deposit) tại Trung tâm nghiên cứu

nguồn gen thuộc Đại học Phenikaa (PU-PRC). Thông tin về hồ sơ chủng và các nguồn gen đã được đăng ký và lưu trữ trong cơ sở dữ liệu được trình bày ở Phụ lục 1.

Bảng 2.2. Danh sách các chủng được sử dụng trong nghiên cứu

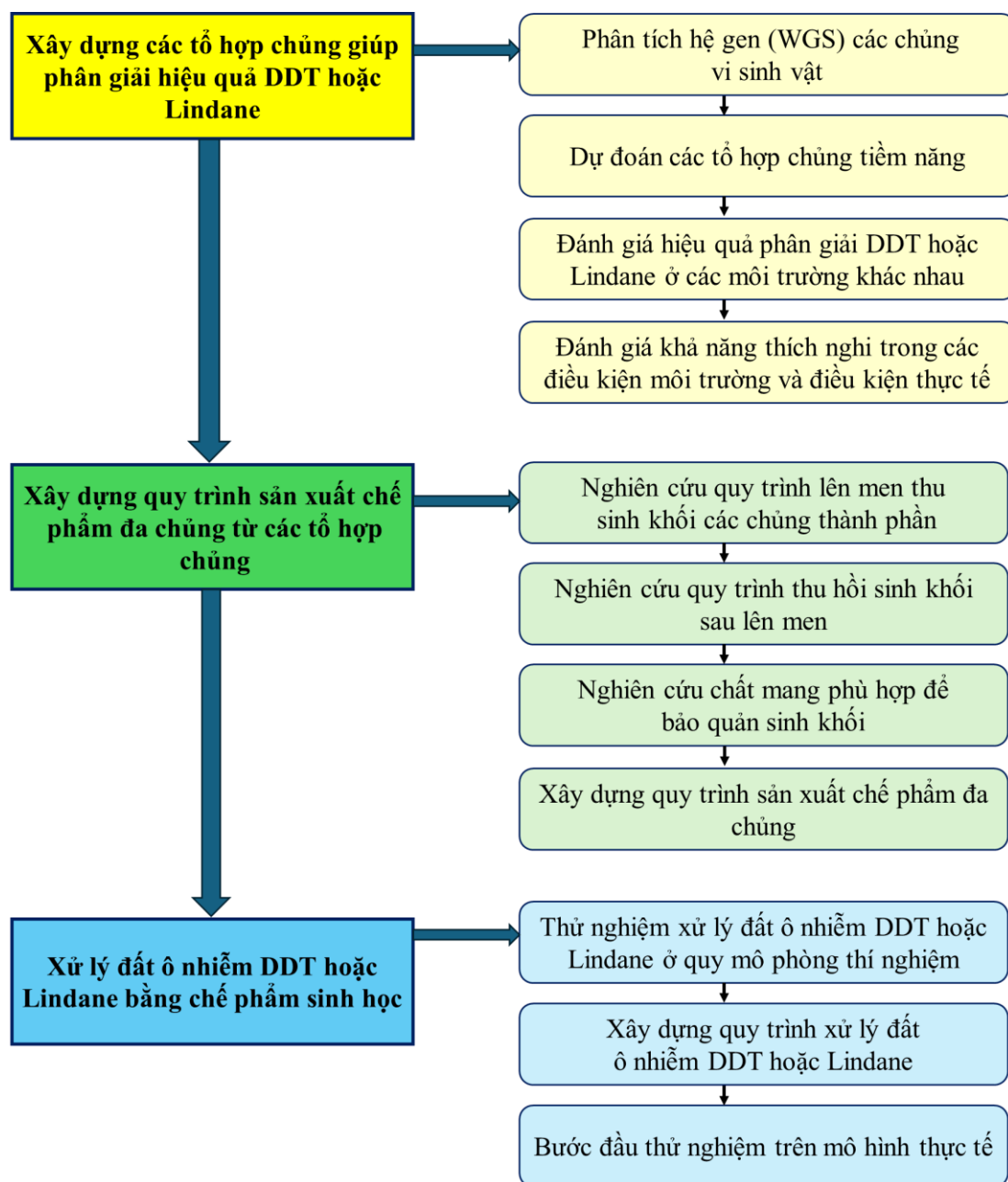
STT	Kí hiệu	Định danh	Mã lưu trữ tại PU-PRC	Có khả năng phân giải DDT	Có khả năng phân giải Lindane
1	T006	<i>Pseudomonas</i> sp. nov.	PU50001	X	
2	T087	<i>Pseudomonas putida</i>	PU50002	X	
3	TN030	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	PU50003	X	
4	PAM64	<i>Pseudomonas lalkuanensis</i>	PU50004	X	
5	PAM67	<i>Pseudomonas anuradhasurensis</i>	PU50005	X	
6	Y077	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	PU50006	X	
7	Y042	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	PU50007	X	
8	Y050	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	PU50008	X	X
9	DDT21	<i>Streptomyces marianii</i>	PU50009	X	
10	DDT23	<i>Streptomyces nojiriensis</i>	PU50010	X	
11	T069	<i>Pseudomonas putida</i>	PU50011		X
12	Y027	<i>Sphingobacterium mizutaii</i>	PU50012		X
13	Y049	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	PU50013		X

STT	Kí hiệu	Định danh	Mã lưu trữ tại PU-PRC	Có khả năng phân giải DDT	Có khả năng phân giải Lindane
14	Y052	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	PU50014		X
15	Y076	<i>Pseudomonas kribbensis</i>	PU50015		X
16	PAM65	<i>Pseudomonas putida</i>	PU50016		X
17	PAM66	<i>Pseudomonas putida</i>	PU50017		X
18	LD02	<i>Streptomyces wuyuanensis</i>	PU50018		X
19	A119	<i>Streptomyces katrae</i>	PU50019		X

2.2 Sơ đồ nghiên cứu

Trên cơ sở bộ chủng vi sinh vật có khả năng phân giải DDT và Lindane đã được tuyển chọn từ các nghiên cứu trước đây, nhóm nghiên cứu muốn hướng tới xây dựng tổ hợp chủng và chế phẩm sinh học có hiệu quả cao trong xử lý đất ô nhiễm các hóa chất bảo vệ thực vật này.

Toàn bộ nội dung nghiên cứu trình bày ở trên có thể được sơ đồ hóa như sau (Hình 2.1):



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

Để đạt được mục tiêu đó, nghiên cứu được triển khai theo ba nội dung chính:

Nội dung 1 là xây dựng các tổ hợp chủng giúp phân giải hiệu quả DDT hoặc Lindane: từ các chủng vi sinh vật được giải trình tự toàn bộ hệ gen (whole genome sequencing – WGS) và dự đoán các tương tác tiềm năng giữa các chủng tuyển chọn được trong chuyển hóa phân giải DDT và Lindane dựa trên kết quả phân tích hệ gen, tính đối kháng và khả năng sinh biosurfactant; từ đó chọn ra một số tổ hợp chủng tiềm năng phân giải hiệu quả DDT và một

số tổ hợp chủng tiềm năng phân giải hiệu quả Lindane. Sau đó, hiệu quả phân giải của những tổ hợp chủng tiềm năng phân giải hiệu quả DDT và những tổ hợp chủng tiềm năng phân giải hiệu quả Lindane được đánh giá trong môi trường lỏng, rắn và bán rắn. Trên cơ sở kết quả thu được, chọn ra một số tổ hợp chủng có khả năng phân giải DDT và một số tổ hợp chủng có khả năng phân giải Lindane với hiệu quả cao. Tiếp đó, nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện trong thực tế (nhiệt độ, pH môi trường, nồng độ chất ô nhiễm, tỷ lệ tiếp giống, nguồn cacbon, nguồn nitơ và các chất dinh dưỡng khác) lên khả năng xử lý DDT hoặc Lindane của các tổ hợp chủng được lựa chọn.

Nội dung 2 là nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm đa chủng từ các tổ hợp chủng xây dựng được: từ kết quả của nội dung 1. Theo đó, hai tổ hợp chủng có hiệu quả phân giải DDT cao nhất và hai tổ hợp chủng có hiệu quả phân giải Lindane cao nhất sẽ được tuyển chọn để nghiên cứu. Các nội dung thực hiện bao gồm: (i) nghiên cứu quy trình lên men nhằm tối ưu hóa điều kiện thu sinh khối của các chủng thành phần, thông qua khảo sát nguồn cacbon và nguồn nitơ phù hợp, sau đó khảo sát tỷ lệ tiếp giống; (ii) nghiên cứu quy trình thu hồi sinh khối sau lên men bằng các phương pháp như lọc, ly tâm và đông khô; (iii) nghiên cứu chất mang và công thức chế phẩm nhằm bảo quản sinh khối hiệu quả, thông qua đánh giá ảnh hưởng của các loại chất mang (tinh bột sắn, cám gạo, than bùn, xỉ than) và các công thức chất mang cải tiến đến khả năng sống sót cũng như hoạt tính khử chloride của các chủng theo thời gian.

Nội dung 3 là thử nghiệm xử lý đất ô nhiễm DDT hoặc Lindane bằng chế phẩm sinh học ở quy mô phòng thí nghiệm và bước đầu thử nghiệm xử lý ở mô hình thực tế: chế phẩm sinh học tốt nhất được lựa chọn để nghiên cứu khả năng xử lý đất ô nhiễm DDT và Lindane ở quy mô phòng thí nghiệm: (i) với các tỷ lệ bổ sung nước khác nhau; (ii) với các tỷ lệ bổ sung chế phẩm khác nhau; và (iii) với sự bổ sung các chất hoạt động bề mặt khác nhau. Trên cơ sở đó, quy trình xử lý đất nhiễm DDT hoặc Lindane bằng chế phẩm tương ứng được xây dựng và bước đầu được thử nghiệm tại các mô hình thực tế.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Phương pháp phân tích hệ gen và xây dựng tổ hợp vi sinh vật

2.3.1.1 Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của mỗi chủng nghiên cứu được tách theo quy trình như sau:

Với mỗi chủng vi khuẩn, chủng được nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB lỏng ở 30°C. Sau đó, 100µL sinh khối được ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút để thu tế bào và tách DNA bằng kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Đức) theo quy trình như trong hướng dẫn đi kèm của nhà sản xuất. Chất lượng sản phẩm tách DNA tổng số được kiểm tra bằng máy quang phổ (LaboMED UV-2502, Hoa Kỳ) và điện di.

Với mỗi chủng xạ khuẩn, chủng được nuôi tăng sinh khối trong môi trường YS ở 30°C trong 48 giờ. Sau đó, 1ml dịch huyền phù được ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút để thu tế bào và tách DNA bằng kit DNeasy® PowerSoil Pro (Qiagen, Đức) theo quy trình như trong hướng dẫn đi kèm của nhà sản xuất. Chất lượng sản phẩm tách DNA tổng số được kiểm tra bằng máy quang phổ (LaboMED UV-2502, Hoa Kỳ) và điện di.

2.3.1.2 Phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS)

Mẫu DNA tổng số đạt yêu cầu chất lượng được giải trình tự bởi công ty LOBI (Việt Nam) bằng hệ thống BGI sequencing DNBseq 150PE. Dữ liệu giải trình tự được đánh giá độ tinh sạch cũng như tinh sạch bằng công cụ FastQC. Những đoạn có độ dài nhỏ hơn 70 bp hoặc chứa trên 10% nucleotide không xác định hoặc 4 loại nucleotide liên tiếp có điểm chất lượng trung bình nhỏ hơn 30 (QC<30 nghĩa là có 1 base sai trong 1000 sẽ bị loại bỏ [136]. Để đánh giá khả năng bị nhiễm của dữ liệu, dữ liệu đọc trình tự được phân loại sử dụng công cụ Kraken2 trên cơ sở dữ liệu miniKraken2. Dữ liệu sau tinh sạch sẽ được dùng để lắp ráp *de novo* hệ gen bằng phần mềm SPAdes với chỉ số k-mer được lựa chọn tự động [142]. Hệ gen sau khi lắp ráp sẽ được đánh giá chất lượng bằng phần mềm QUAST dựa trên các tiêu chí: kích thước hệ gen tổng số, độ dài contig lớn nhất và chỉ số N50 [139].

2.3.1.3 Phương pháp lắp ráp, đánh giá chất lượng và chú giải hệ gen

Trước khi chú giải hệ gen, để đảm bảo tính chính xác, chất lượng dữ liệu trình tự thu được sau khi lắp ráp *de novo* sẽ được đánh giá bằng phần mềm BUSCO [147].

Hệ gen sau khi lắp ráp *de novo* được dự đoán gen và chú giải chức năng bằng phần mềm Prokka: trên cơ sở dữ liệu trình tự các contig của hệ gen quan tâm, Prokka dùng các thuật toán và cơ sở dữ liệu sẵn có dự đoán chức năng gen và đưa ra bộ dữ liệu về chức năng của các gen và các sản phẩm (protein, enzyme) liên quan. Dữ liệu protein chú giải được sắp xếp vào những nhóm chức năng COG (Cluster of Orthologous Groups) bằng phần mềm EggNOG (evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Group).

Dữ liệu về protein sau khi hệ gen được chú giải bằng Prokka sẽ được phân tích, sử dụng cơ sở dữ liệu (CSDL) và các công cụ của KEGG để dự đoán các con đường trao đổi chất của mỗi chủng hay tổ hợp chủng. Trong cơ sở dữ liệu KEGG, hai nhóm con đường trao đổi chất có liên quan nhất đến đề tài nghiên cứu là “Global and overview maps” (các con đường cơ bản) và “Xenobiotics biodegradation and metabolism” (các con đường chuyển hóa các chất khó phân hủy, có thể liên quan đến phân giải DDT và Lindane). Vì vậy, hai nhóm này được sử dụng chính trong phân tích khả năng trao đổi chất và tiềm năng phân giải DDT và Lindane của các chủng nghiên cứu. Số lượng enzyme trong các nhóm con đường này của các chủng được thống kê và đối sánh.

Các công cụ KEGG Mapper – Reconstruct (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/reconstruct.html>), công cụ KEGG Mapper – Search (<https://www.kegg.jp/kegg/mapper/search.html>) và công cụ KEGG Mapper – Color (<https://www.kegg.jp/kegg/mapper/color.html>) được sử dụng để tạo và phân tích bản đồ chuyển hóa của từng chủng vi sinh vật thông qua hệ thống KEGG Orthology (KO) được xây dựng từ dữ liệu genome [143]. Dựa vào bản đồ chuyển hóa, tiến hành đánh giá tiềm năng trao đổi chất của các chủng vi sinh vật về các phương diện như số lượng gen được chú giải, số lượng con đường chuyển hóa, và loại con đường chuyển hóa.

2.3.1.4 Phương pháp phân tích genome-mining và dự đoán tổ hợp vi sinh vật

Các bản đồ chuyển hóa các đơn chủng (thu được ở trên) được quan sát và đối sánh để tìm ra những điểm hỗ trợ về các con đường trao đổi chất có thể có giữa các chủng. Bản đồ chuyển hóa chung của tổ hợp các chủng bất kì cũng được xây dựng bằng các công cụ KEGG Mapper – Reconstruct, công cụ KEGG Mapper – Search và công cụ KEGG Mapper – Color trình bày ở trên [143]. Các bản đồ này được thể hiện theo hướng chỉ rõ các con đường chung và các con đường chuyển hóa đặc thù của từng đơn chủng trong tổ hợp, theo cả hai khía cạnh: các con đường trao đổi chất cơ bản và các con đường trao đổi chất liên quan đến phân giải DDT và Lindane. Các con đường chuyển hóa đặc trưng của từng đơn chủng trong tổ hợp được lọc bằng Microsoft Excel.

Trên cơ sở phân tích, dự đoán các tương tác hỗ trợ giữa các chủng về trao đổi chất dựa vào các bản đồ chuyển hóa, các tổ hợp chủng có tiềm năng trao đổi chất đa dạng, trong đó các chủng hỗ trợ nhiều cho nhau, được đề xuất xây dựng. Bên cạnh bản đồ trao đổi chất, những thông tin về đặc điểm sinh lý, sinh hóa chung của các chủng, đặc biệt là về tính đối kháng và khả năng sinh biosurfactant cũng được cân nhắc trong quá trình xây dựng các tổ hợp chủng. Từ đó, đưa ra được 10 tổ hợp chủng tiềm năng phân giải hiệu quả DDT và 10 tổ hợp chủng tiềm năng phân giải hiệu quả Lindane.

2.3.2 Phương pháp đánh giá hiệu quả phân giải của các tổ hợp vi sinh vật

2.3.2.1 Chuẩn bị sinh khối với đơn chủng và tổ hợp vi sinh vật

Chuẩn bị sinh khối đơn chủng

Đối với các chủng vi khuẩn: dịch nuôi cấy mới của từng chủng được chuẩn bị bằng cách lắc ủ trong môi trường LB ở 200 vòng/phút, 30°C, thường trong 12 giờ. Dịch nuôi cấy sau đó được ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút để thu sinh khối. Cặn tế bào thu được được rửa hai lần bằng dung dịch muối sinh lý: đảo trộn để hòa đều rồi ly tâm lại ở 6000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi rửa, cặn tế bào được hòa trong một thể tích thích hợp môi trường MSM để thu được huyền phù tế bào có mật độ xấp xỉ 1×10^9 CFU/mL.

Đối với các chủng xạ khuẩn: sinh khối được chuẩn bị dưới dạng bào tử. Chủng được nuôi trên đĩa thạch YS cho đến khi trưởng thành và tạo bào tử, thường sau 5 – 7 ngày. Bào tử

sau đó được thu bằng cách bổ sung thêm 3 – 5 mL dung dịch 0,001% Tween 80 và cạo nhẹ bằng que cấy vô trùng. Mật độ (CFU/mL) của dịch huyền phù này được xác định bằng phương pháp pha loãng tuần tự và cấy trải trên đĩa thạch YS. Khi sử dụng trong thí nghiệm, dịch bào tử gốc sẽ được pha loãng với một thể tích thích hợp môi trường MSM để đạt mật độ xấp xỉ 1×10^9 CFU/mL.

Chuẩn bị sinh khối các tổ hợp chủng

Dịch huyền phù của mỗi tổ hợp chủng được tạo bằng cách trộn các thể tích bằng nhau của dịch huyền phù từng chủng riêng lẻ có cùng mật độ sinh khối ($\sim 10^9$ CFU/mL) theo công thức tổ hợp đã xác định. Như vậy, trong tổ hợp này, tổng mật độ vi sinh vật khoảng 10^9 CFU/mL. Tỷ lệ phối trộn có thể là 1:1:1 (đối với tổ hợp 3 chủng), 1:1:1:1 (đối với tổ hợp 4 chủng) hoặc 1:1:1:1:1 (đối với tổ hợp 5 chủng), tùy theo công thức của từng tổ hợp.

2.3.2.2 Đánh giá khả năng phân giải DDT hoặc Lindane của các tổ hợp trong các môi trường khác nhau

Các tổ hợp chủng và các chủng đơn lẻ được thử nghiệm khả năng phân giải DDT và Lindane trong môi trường MSM dạng lỏng, bán rắn (0,25% thạch) và rắn (1,6% thạch) có chứa 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane. Đầu tiên, 100 μ L của mỗi dịch huyền phù cần thử nghiệm (chuẩn bị như mô tả ở mục 2.3.2.1) được bổ sung vào 1000 μ L môi trường MSM lỏng hoặc lên bề mặt thạch của 1000 μ L môi trường MSM bán rắn hoặc rắn trong ống nghiệm. Nếu ống nghiệm chứa môi trường bán rắn hoặc rắn, ống được xoay nhẹ bằng tay để dung dịch trải đều trên bề mặt thạch. Với mỗi thí nghiệm, ba ống nghiệm (3 lần lặp lại) được chuẩn bị. Các mẫu được ủ ở pH 7,0 và 30°C (lắc ở 200 vòng/phút chỉ đối với mẫu nuôi lỏng). Hiệu suất phân giải DDT hoặc Lindane của mỗi mẫu được đánh giá bằng cách đo nồng độ DDT hoặc Lindane còn lại trong môi trường sau 7 ngày và 14 ngày bằng sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID) (xem mô tả mục 2.3.6.2).

Trước khi phân tích GC-FID tại mỗi thời điểm, để chiết DDT trong thí nghiệm môi trường lỏng, 1000 μ L chloroform được thêm vào mỗi ống nghiệm. Ống được đảo trộn (vortex) khoảng 20 giây để chiết DDT. Tương tự, để chiết DDT trong thí nghiệm môi trường bán rắn hoặc rắn, 1000 μ L chloroform được thêm vào mỗi ống nghiệm và khối thạch đông được cắt

bằng que nhọn thành bốn phần bằng nhau. Ống sau đó được để yên trong 16 giờ. Khoảng 300 μL dung dịch chiết (pha chloroform) chứa DDT được lấy để phân tích GC-FID.

Tương tự, để chiết Lindane với môi trường lỏng, tại mỗi thời điểm kiểm tra, 1000 μL n-hexane được thêm vào từng ống nghiệm. Ống được đảo trộn (vortex) khoảng 20 giây để chiết Lindane. Đối với môi trường bán rắn hoặc rắn, tại mỗi thời điểm kiểm tra, 1000 μL n-hexan được thêm vào từng ống nghiệm và khối thạch đông được cắt bằng que nhọn thành bốn phần có thể tích bằng nhau. Sau đó, ống được để yên trong 16 giờ. Khoảng 300 μL dung dịch chiết (pha n-hexan) chứa Lindane được lấy để phân tích bằng GC-FID.

Nồng độ DDT hoặc Lindane được xác định dựa theo đường chuẩn được thiết lập tại mỗi thời điểm đo. Hiệu suất phân giải của mỗi mẫu sau đó sẽ được tính bằng công thức:

$$\text{Hiệu suất phân giải (H\%)} = \frac{(\text{nồng độ DDT ban đầu} - \text{nồng độ DDT trong mẫu})}{\text{nồng độ DDT ban đầu}} \times 100\%$$

Hiệu quả phân giải của một tổ hợp chủng so với các đơn chủng thành phần được đánh giá thông qua tỷ lệ % chênh lệch giữa hiệu suất phân giải của tổ hợp và hiệu suất phân giải trung bình của các đơn chủng (trong cùng một điều kiện thí nghiệm được thực hiện). Nếu tỷ lệ phần trăm chênh lệch này là >0 thì chúng tôi giả thuyết rằng các chủng có tác dụng hỗ trợ (tương tác dương), làm cho tổ hợp phân giải hiệu quả hơn; độ chênh lệch càng lớn thì tác dụng hỗ trợ càng mạnh. Ngược lại, nếu tỷ lệ phần trăm chênh lệch này là <0 thì giả thuyết rằng các chủng có tác dụng kìm hãm triệt tiêu lẫn nhau (tương tác âm), làm cho tổ hợp phân giải kém hiệu quả hơn; độ chênh lệch càng lớn thì tương tác âm đó càng mạnh.

2.3.2.3 Đánh giá khả năng phân giải DDT hoặc Lindane của các tổ hợp chủng đề xuất trong các điều kiện thực tế

Sau khi khảo sát khả năng phân giải ở các môi trường khác nhau, 5 tổ hợp chủng có khả năng phân hủy DDT hiệu quả nhất và 5 tổ hợp chủng có khả năng phân hủy Lindane hiệu quả nhất được lựa chọn. Tiếp theo, ảnh hưởng của các điều kiện thực tế đến hiệu quả phân giải DDT và Lindane của các tổ hợp này được khảo sát.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

10% thể tích mỗi tổ hợp cần khảo sát được cho vào ống nghiệm chứa môi trường MSM lỏng có 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane để đạt tổng thể tích 2 mL. Các mẫu này được ủ lắc (150 vòng/phút) ở các nhiệt độ khác nhau: 10, 25, 30 và 40°C. Sau 7 ngày, dịch được đem ra phân tích khả năng loại chloride như mô tả ở mục 2.3.6.1.

Ảnh hưởng của pH

10% thể tích mỗi tổ hợp được cho vào ống nghiệm chứa môi trường MSM lỏng có 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane (tổng thể tích 2 mL). pH của môi trường MSM được điều chỉnh trước bằng dung dịch HCl 0,1 M hoặc NaOH 0,1 M đến các mức pH cần khảo sát (3, 5, 7, 9 hoặc 11). Các mẫu được ủ lắc (150 vòng/phút) ở 30°C. Sau 7 ngày, dịch được đem ra phân tích khả năng loại chloride như mô tả ở mục 2.3.6.1.

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

10% thể tích mỗi tổ hợp được cho vào ống nghiệm chứa môi trường MSM lỏng có nồng độ DDT là (0, 2, 5, 10, 20 or 30 ppm) hoặc nồng độ Lindane là (0, 5, 10, 30, 50 hoặc 70 ppm). Mỗi mẫu được ủ lắc (150 vòng/phút) ở 30 °C. Sau 7 ngày, dịch được đem ra phân tích khả năng loại chloride như mô tả ở mục 2.3.6.1.

Ảnh hưởng của nguồn cacbon bổ sung

10% thể tích mỗi tổ hợp được cho vào ống nghiệm chứa môi trường MSM lỏng có 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane (tổng thể tích 2 mL). Đồng thời, bổ sung các nguồn cacbon khác nhau với lượng mol C tương đương: 1 g/L đối với fructose hoặc galactose ($M = 180,16$), 0,95 g/L đối với maltose, lactose hoặc sucrose ($M = 242,3$), hoặc 0,52 g/L đối với phenol ($M = 94,11$). Mỗi mẫu được ủ lắc (150 vòng/phút) ở 30°C. Sau 7 ngày, dịch được đem ra phân tích khả năng loại chloride như mô tả ở mục 2.3.6.1.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung

10% thể tích mỗi tổ hợp được cho vào ống nghiệm chứa môi trường MSM lỏng có 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane (tổng thể tích 2 mL). Đồng thời, bổ sung các nguồn nitơ khác nhau với lượng mol N tương đương: 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($M = 132,14$), 1,23 g/L ammonium citrate ($M = 243,22$), 1,53 g/L KNO_3 ($M = 101,1$), 1,51 g/L peptone (tổng N $\geq 14\%$) hoặc 1,14 g/L glycine ($M = 75,07$). Peptone đại diện cho nguồn nitơ hữu cơ giàu dinh dưỡng,

glycine là axit amin dễ sử dụng, các chất khác cung cấp các nguồn nitơ vô cơ dạng NH_4^+ hoặc NO_3^- . Mỗi mẫu được ủ lắc (150 vòng/phút) ở 30°C. Sau 7 ngày, dịch được đem ra phân tích khả năng loại chloride như mô tả ở mục 2.3.6.1.

Ảnh hưởng của nguyên tố vi lượng

10% thể tích mỗi tổ hợp được cho vào ống nghiệm chứa môi trường MSM lỏng có 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane (tổng thể tích 2 mL). Dung dịch vi lượng được bổ sung với tỷ lệ xác định (0,1; 0,5; 1; 2 hoặc 5%). Mỗi mẫu được ủ lắc (150 vòng/phút) ở 30°C. Sau 7 ngày, dịch được đem ra phân tích khả năng loại chloride như mô tả ở mục 2.3.6.1.

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống

Mỗi tổ hợp được bổ sung vào ống nghiệm chứa môi trường MSM lỏng có 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane với các tỷ lệ 5%, 10%, 15% hoặc 20% (v/v), đến tổng thể tích là 2 mL. Mỗi mẫu được ủ lắc (150 vòng/phút) ở 30 °C. Sau 7 ngày, dịch được đem ra phân tích khả năng loại chloride như mô tả ở mục 2.3.6.1.

2.3.3 Phương pháp xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm đa chủng

2.3.3.1 Khảo sát điều kiện lên men thu sinh khối các chủng sử dụng tạo chế phẩm

Sau khi khảo sát các điều kiện thực tế, 2 tổ hợp chủng có khả năng phân hủy DDT hiệu quả nhất và 2 tổ hợp chủng có khả năng phân hủy Lindane hiệu quả nhất được lựa chọn để nghiên cứu tạo chế phẩm. Trước hết, cần nghiên cứu quy trình lên men thu sinh khối các đơn chủng thành phần trong các tổ hợp này một cách hiệu quả. Công việc này bao gồm các thí nghiệm chọn môi trường lên men phù hợp.

Việc xác định môi trường phù hợp dùng cho lên men các chủng được khảo sát bằng cách đánh giá khả năng sinh trưởng của chúng với các nguồn cacbon và nguồn nitơ khác nhau. Các thí nghiệm được tiến hành theo các bước như sau:

Chuẩn bị giống: Các chủng nghiên cứu sẽ được hoạt hóa trên đĩa LB hoặc YS để thu khuẩn lạc mới. Khuẩn lạc vi khuẩn sau đó được nhặt để tiếp giống vào môi trường LB lỏng, nuôi lắc ở 150 vòng/phút, 30°C. Sau 24 giờ, thu sinh khối vi khuẩn bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 15 phút. Sinh khối được rửa 2 lần bằng MSM, ly tâm bỏ dịch, cuối cùng được hòa lại bằng MSM. Bào tử xạ khuẩn được thu trực tiếp trên đĩa YS và hòa lại bằng MSM. Các loại dịch huyền phù có OD_{600nm} khoảng 1,0 sẽ được dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát nguồn cacbon

Dịch huyền phù được tiếp giống 5% vào các ống nghiệm chứa môi trường MSM bổ sung một trong các nguồn cacbon thử nghiệm sau với tỷ lệ 1% (glucose, sucrose, maltose, tinh bột tan, hoặc rỉ đường). Sau đó, nuôi lắc ở 150 vòng/phút, 30°C. OD_{600nm} được xác định sau các mốc thời gian cố định, sau đó được phân tích so sánh để đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn nghiên cứu trong MSM bổ sung các nguồn cacbon thay thế; từ đó lựa chọn nguồn cacbon phù hợp nhất cho thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát nguồn nitơ

Dịch huyền phù được tiếp giống 5% vào các ống nghiệm chứa môi trường MSM bổ sung 1% nguồn cacbon thay thế phù hợp nhất đã xác định và 0,1% nguồn nitơ thay thế thử nghiệm (amonium sulfate, potassium nitrate, nước mắm, cao nấm men, bột đậu tương). Sau đó, nuôi lắc 150 vòng/phút, 30°C. OD_{600nm} được xác định sau các mốc thời gian cố định, sau đó được phân tích so sánh để đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn nghiên cứu trong MSM bổ sung các nguồn nitơ thay thế; từ đó lựa chọn nguồn nitơ phù hợp nhất cho thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát tỷ lệ tiếp giống

Sinh khối chủng nghiên cứu được chuẩn bị như trên ở dạng 50 mL dịch huyền phù trong môi trường MSM (mật độ $\sim 10^9$ CFU/ml), và được tiếp giống vào bình tam giác chứa 450mL môi trường lỏng tương ứng (tỷ lệ 10%), lắc 150 vòng/phút, ở 30°C cho đến khi mật độ vi sinh vật đạt 10^9 CFU/ml. Giống này được sử dụng để tiếp giống theo tỷ lệ thử nghiệm (5%, 10%, 15%) vào nồi lên men chứa 9,5 L môi trường MSM chứa nguồn cacbon và nitơ tối ưu. Tiến hành lên men ở điều kiện: nhiệt độ 30°C, pH 7,0, tốc độ khuấy 50 vòng/phút. Xác định OD ở bước sóng 600nm.

2.3.3.2 Khảo sát các phương án thu hồi sinh khối sau lên men

Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được nuôi cấy với thể tích 600 mL trong điều kiện 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Quá trình nuôi cấy vi khuẩn được thực hiện trong môi trường LB trong thời gian 24 giờ và xạ khuẩn được nuôi trong môi trường YS trong 48 giờ. Dịch huyền phù này sau đó sẽ được sử dụng ở các thí nghiệm sau.

Sau thu hồi, sinh khối thu được được hòa vào dung dịch muối sinh lý thể tích tương đương lúc trước thu hồi (600 mL). Trước và sau thu hồi, dịch chứa sinh khối được xác định mật độ vi khu như trình bày ở mục 2.2.4, sử dụng môi trường nuôi cấy là LB ủ trong 24 giờ đối với mẫu vi khuẩn hoặc sử dụng môi trường nuôi cấy là YS ủ trong 48 giờ, ở 30°C, đối với mẫu xạ khuẩn.

Hiệu suất thu hồi được tính bằng công thức:

$$\text{Hiệu suất thu hồi (H\%)} = \frac{\text{Mật độ CFU sau thu hồi}}{\text{Mật độ trước thu hồi}} \times 100\%$$

Thử nghiệm thu hồi sinh khối bằng phương án đông khô

Thí nghiệm được thực hiện theo các bước cụ thể như sau: Dịch huyền phù sau lên men được chuyển vào các đĩa petri chứa sữa gầy 20% và acid glutamic 1% (tỷ lệ 1:1). Đông khô mẫu trong 24 giờ ở -30°C.

Thu hồi bằng phương án ly tâm

Thí nghiệm được thực hiện theo các bước cụ thể như sau: Dịch huyền phù sau lên men được chuyển vào các ống falcon, ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút, bỏ dịch, giữ sinh khối.

Thu hồi bằng phương án lọc

Thí nghiệm được thực hiện theo các bước sau: Dịch huyền phù vi khuẩn sau lên men được lọc bằng hệ thống lọc tiếp tuyến, tốc độ máy bơm 300 vòng/ phút, kích cỡ cột lọc 0,2µm. Riêng với xạ khuẩn, do sinh khối ở dạng sợi vón cục, chúng tôi tiến hành lọc bằng giấy lọc 0,45µm.

2.3.3.3 Khảo sát chất mang phù hợp để bảo quản chế phẩm

Dịch huyền phù vi sinh vật được chuẩn bị như sau: (i) với các chủng vi khuẩn: sau khi nuôi cấy 1 trên môi trường LB ở 30°C trong 24 giờ đạt OD_{600nm} = 1,0 – 1,1 (tương đương khoảng 10⁸ CFU/mL) thì chuyển 10% dịch huyền phù cấp 1 này vào môi trường LB, nuôi lắc (200 vòng/phút, 30°C, 24 giờ), sau đó ly tâm (6000 vòng/phút, 15 phút), rửa hai lần bằng dung dịch MSM vô trùng và tạo huyền phù trở lại trong MSM; (ii) với các chủng xạ khuẩn:

sau khi nuôi trên thạch YS (30°C, 5 ngày) để hình thành bào tử, bổ sung 2–3 mL nước cất chứa 0,01% Tween 80, cạo bề mặt thạch để thu bào tử và đảo trộn (vortex) để đồng nhất dịch bào tử. Mật độ với các chủng vi khuẩn đạt $10^9 - 10^{10}$ CFU/mL còn xạ khuẩn đạt $10^8 - 10^9$ CFU/mL. Sinh khối thu được được phối trộn với một trong các loại chất mang (than bùn, xỉ than, tinh bột sắn hoặc cám gạo) theo công thức chất mang: silica: sinh khối = 9:1:1 (tỷ lệ khối lượng). Chất mang được sấy khô ở 60°C, rây mịn và khử trùng hai lần ở 110°C trong 20 phút. Chế phẩm sau phối trộn được chia vào các túi bạc 1 g, hút chân không, hàn kín, bảo quản ở nhiệt độ phòng và kiểm tra ở các mốc thời gian 0, 1, 2, 3, 4, 5 và 6 tháng. Mỗi mốc thời gian sẽ lấy hai túi từ mỗi loại chất mang và mỗi chủng vi sinh vật được lấy ra để đánh giá khả năng sống sót và hoạt tính phân hủy DDT hoặc Lindane của chế phẩm thông qua khả năng loại chloride.

Đánh giá khả năng sống sót của vi khuẩn và xạ khuẩn: Lấy 1g chế phẩm trộn với 9mL MSM lỏng, thu được dịch huyền phù ở độ pha loãng 10^{-1} . Sau đó, tiếp tục pha loãng, cấy trải đếm CFU trên môi trường thạch LB với vi khuẩn hoặc trên môi trường thạch YS với xạ khuẩn theo phương pháp thường quy (mục 2.2.4).

Đánh giá hoạt tính phân hủy DDT hoặc Lindane của chế phẩm thông qua khả năng loại chloride: Hút 1mL dịch huyền phù độ pha loãng 10^{-1} nêu trên vào ống nghiệm chứa 1mL MSM lỏng bổ sung 60 ppm DDT để đạt nồng độ cuối cùng 30 ppm (nếu thí nghiệm với DDT) hoặc bổ sung 100 ppm Lindane để đạt nồng độ cuối cùng 50 ppm (nếu thí nghiệm với Lindane), rồi ủ lắc ở 150 vòng/phút, 30°C. Sau 7 ngày, mẫu được ly tâm 6000 vòng/phút, trong 15 phút và lượng chloride tự do trong phần dịch trong được phân tích theo phương pháp trình bày ở mục 2.3.6.1; qua đó đánh giá được hoạt tính loại chloride của mẫu tại thời điểm nghiên cứu.

Thử nghiệm cải tiến công thức chất mang

Sau khi chọn được chất mang thích hợp, sinh khối vi khuẩn hoặc xạ khuẩn được chuẩn bị như mô tả ở mục 2.3.4.3. Sinh khối sau đó sẽ được trộn với chất mang theo tỷ lệ 10 chất mang: 1 sinh khối, rồi đem sấy ở 40°C trong 3 giờ. Đồng thời, đối chứng tương ứng là công thức cũ của cùng loại chất mang nhưng có bổ sung silica (mục 2.3.4.3). Chế phẩm sau phối trộn được chia vào các túi bạc 1 g, hút chân không, hàn kín, bảo quản ở nhiệt độ phòng và

kiểm tra ở các mốc thời gian 0, 1, 2, 3, 4, 5 và 6 tháng. Ở mỗi mốc thời gian, hai túi trong mỗi trường hợp thí nghiệm được lấy ra để đánh giá khả năng sống sót và hoạt tính phân hủy DDT hoặc Lindane của chế phẩm thông qua khả năng loại chloride như mô tả ở mục 2.3.6.1.

2.3.4 Xây dựng quy trình xử lý đất ô nhiễm DDT và Lindane bằng chế phẩm sinh học và bước đầu thử nghiệm trên mô hình thực tế

2.3.4.1 Xây dựng quy trình xử lý đất ô nhiễm DDT và Lindane bằng chế phẩm sinh học

Kết quả phân tích của nhóm cho thấy loại đất được lựa chọn cho thử nghiệm (trình bày ở mục 2.1.1) không chứa DDT và Lindane. Mẫu đất sau đó được sấy ở 60°C trong khoảng 10 giờ cho đến khi khô hoàn toàn, rây mịn và được bổ sung DDT 30 ppm hoặc Lindane 50 ppm để mô phỏng ô nhiễm.

Sau khi chọn được phương án chất mang phù hợp nhất, chế phẩm đơn chủng được chuẩn bị như mô tả ở mục 2.3.4.3. Các chế phẩm đơn chủng được kiểm tra mật độ bằng phương pháp pha loãng cấy trải. Chỉ có các chế phẩm đạt mật độ cuối cùng khoảng 10^7 - 10^8 CFU/g mới được dùng cho thử nghiệm.

Để tạo mỗi chế phẩm dạng tổ hợp chủng, các chế phẩm đơn chủng thành phần được trộn (theo công thức tương ứng của tổ hợp) sao cho tỷ lệ thành phần về mật độ giữa các chủng là tương đương. Mỗi chế phẩm tạo được cũng có mật độ cuối cùng khoảng 10^7 - 10^8 CFU/g chế phẩm.

Khảo sát tỷ lệ nước khác nhau

Bổ sung chế phẩm với tỷ lệ 10% (khối lượng) vào đất thử nghiệm. Bổ sung dung dịch stock DDT hoặc Lindane để thu được hỗn hợp chứa 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane. Bổ sung nước lần lượt 10, 20, 30, 50, 70 mL cho mỗi 100g đất, tương ứng với tỷ lệ nước là 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, rồi trộn đều, giữ trong điều kiện nhiệt độ phòng. Sau các mốc thời gian cố định (1, 7, 14 ngày), lấy 0,5g đất từ các vị trí ngẫu nhiên khác nhau, chiết và phân tích nồng độ DDT hoặc Lindane trong mẫu bằng GC-MS như trình bày ở mục 2.3.6.3. Từ các kết quả thu được, đánh giá và so sánh hiệu quả phân giải DDT hay Lindane giữa các trường hợp thí nghiệm để chọn tỷ lệ bổ sung nước phù hợp (tỷ lệ này được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo).

Khảo sát tỷ lệ chế phẩm khác nhau

Bổ sung chế phẩm lần lượt 1 g, 5 g, 10 g, 15 g, 20 g vào đất để tổng khối lượng mỗi mẫu là 100 g, tương ứng các tỷ lệ chế phẩm là 1%, 5%, 10%, 15%, 20% (khối lượng). Bổ sung dung dịch stock DDT hoặc Lindane để thu được hỗn hợp chứa 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane, rồi trộn đều, tiếp tục bổ sung nước theo tỷ lệ nước đã tối ưu bên trên. Sau các mốc thời gian cố định (1, 7, 14 ngày), lấy 0,5 g đất từ các vị trí ngẫu nhiên khác nhau, chiết và phân tích nồng độ DDT hoặc Lindane trong mẫu bằng GC-MS như trình bày ở mục 2.3.6.3. Từ các kết quả thu được, đánh giá và so sánh hiệu quả phân giải DDT hay Lindane giữa các trường hợp thí nghiệm để chọn tỷ lệ chế phẩm bổ sung phù hợp (tỷ lệ này được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo).

Khảo sát các chất hoạt động bề mặt khác nhau

Bổ sung nước và chế phẩm theo tỷ lệ phù hợp đã lựa chọn. Bổ sung dung dịch stock DDT hoặc Lindane để thu được hỗn hợp chứa 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane. Các mẫu sẽ được thử nghiệm bổ sung chất hoạt động bề mặt với các phương án như sau: Tween 80 (ở các tỷ lệ 0,01%; 0,1% và 1%), Rhamnolipids (ở các tỷ lệ 0,01%; 0,05% và 0,1%), Digalactosyl Diglyceride (ở các tỷ lệ 0,00002%; 0,00004% và 0,00008%). Sau các mốc thời gian cố định (1, 7, 14 ngày), lấy 0,5 g đất từ các vị trí ngẫu nhiên khác nhau, chiết và phân tích nồng độ DDT hoặc Lindane trong mẫu bằng GC-MS như trình bày ở mục 2.3.6.3. Từ các kết quả thu được, đánh giá và so sánh hiệu quả phân giải DDT hay Lindane giữa các trường hợp thí nghiệm để chọn chất hoạt động bề mặt phù hợp và tỷ lệ bổ sung phù hợp nhằm tạo chế phẩm sinh học.

Trên cơ sở các kết quả khảo sát nêu trên, các quy trình sử dụng chế phẩm sinh học để xử lý đất nhiễm DDT và đất nhiễm Lindane được xây dựng.

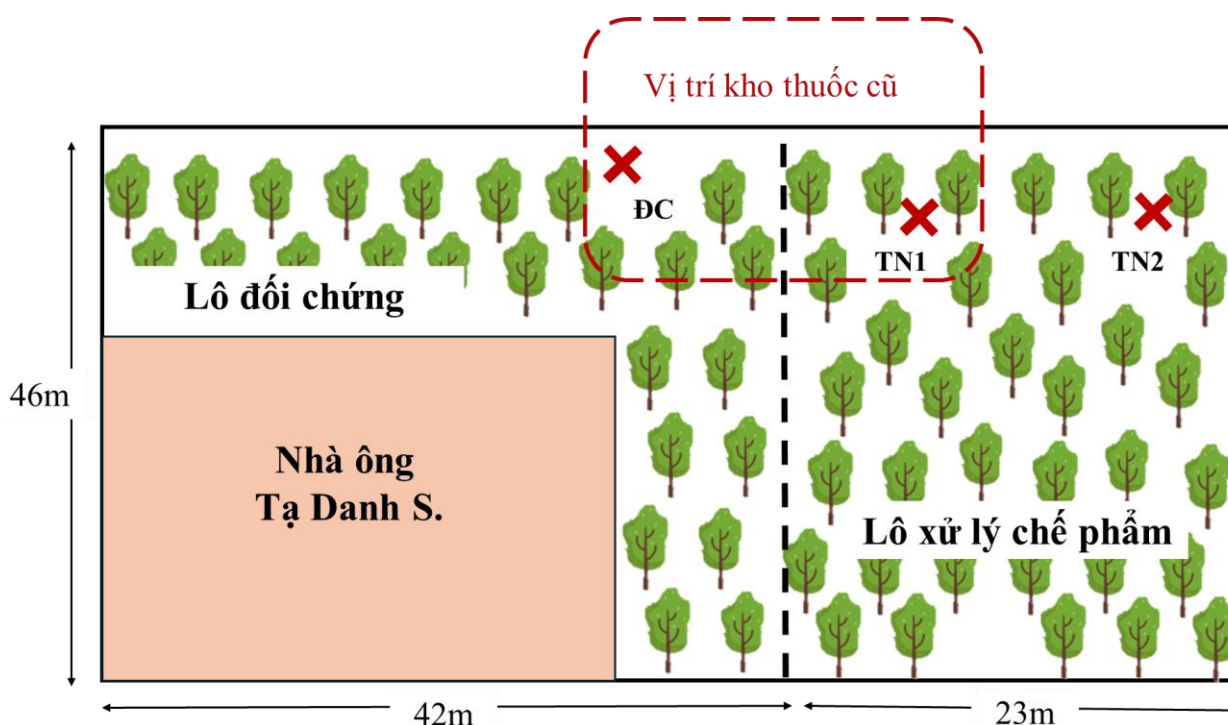
2.3.4.2 Bước đầu thử nghiệm xử lý đất nhiễm DDT/Lindane trên mô hình thực tế

Mô hình xử lý ô nhiễm DDT

Mô hình thử nghiệm xử lý DDT được tiến hành ở Nghệ An, cụ thể là tại vườn keo của ông Tạ Danh S., xã Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An (tọa độ 19°19'1"B; 105°29'4"Đ). Lô đất có diện tích khoảng 0,2 ha, với nồng độ DDT tồn dư được phân tích là 19,25 ppm. Theo thông tin từ

chính quyền địa phương, khu vực này trước đây nằm cạnh kho thuốc cũ của Bệnh viện – nơi tập kết của nhiều hóa chất trong đó có Lindane, DDT. Trong quá trình khảo sát, người dân địa phương cho biết một số hộ gia đình trong khu vực có người mắc ung thư.

Mô hình được triển khai trực tiếp ngoài thực địa với 02 lô là lô thí nghiệm có xử lý theo quy trình đã xây dựng và lô đối chứng giữ nguyên hiện trạng (Hình 2.2). Để đảm bảo không ảnh hưởng đến các cây keo đang trồng nên phương án được xử lý theo từng hố. Cụ thể, mỗi hố có kích thước sâu 80–100 cm, rộng khoảng 100 cm và được bố trí cách nhau 30–50 cm, phù hợp với vị trí các cây keo. Lượng đất đào từ mỗi hố được tập kết thành từng đống riêng, sau đó trộn đều với chế phẩm theo đúng tỷ lệ trước khi lấp trở lại.



Hình 2.2. Bố trí mô hình xử lý đất ô nhiễm DDT

Ghi chú: ĐC: Vị trí lấy mẫu ở lô đối chứng; TN1 và TN2: Vị trí lấy mẫu 1 và 2 ở lô thí nghiệm

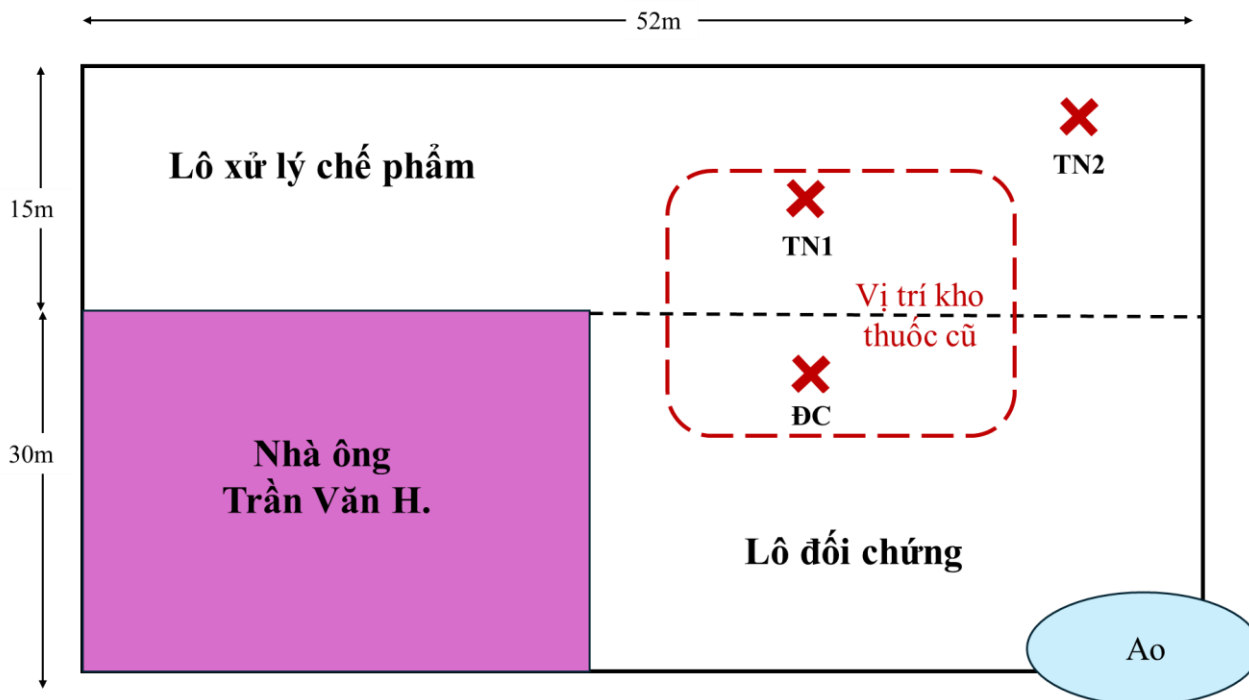
Lô thí nghiệm được tiến hành xử lý như sau: Chế phẩm có hiệu quả phân giải DDT tốt nhất được lựa chọn được bổ sung vào đất đã xử lý sơ bộ theo tỷ lệ 5% khối lượng bằng cách rải đều, sau đó trộn đều, rồi cho đất đã trộn chế phẩm xuống hố tương ứng, lấp lại như cũ. Chuẩn bị lượng dung dịch phụ gia (Tween 80) tương ứng với khối lượng đất cần xử lý: 1 lít dung dịch phụ gia cho 1 m³ đất (để đạt được tỷ lệ bổ sung cuối cùng là 0,1% (v/w)). Căn

cứ vào độ ẩm của đất là 50%, để đạt độ ẩm cuối cùng là 70% (theo quy trình xử lý), cần bổ sung thêm $70\% - 50\% = 20\%$, nghĩa là cho 1 m^3 đất cần bổ sung 200 lít nước. Bổ sung lượng dung dịch phụ gia nêu trên vào lượng nước cần bổ sung, khuấy đều đến hòa tan để thu được nước chứa Tween 80. Sau khi chuẩn bị nước chứa Tween 80, bổ sung nước này vào đất trong mỗi hố đã bổ sung chế phẩm sinh học (đang tiến hành ở bước trên) (tỷ lệ nước cuối cùng trong đất sẽ là 70%); vừa bổ sung vừa kết hợp đảo trộn đều. Sau khi tiến hành theo quy trình đã xây dựng, mẫu đất ở lô thí nghiệm sẽ được lấy mẫu và phân tích nồng độ DDT vào thời điểm 0, 6 tuần và 12 tuần. Đất ở lô đối chứng được lấy mẫu và phân tích ở thời điểm cuối là 12 tuần.

Mô hình xử lý ô nhiễm Lindane

Trên cơ sở tham khảo công văn số 1927/STNMT-MT ngày 22/6/2020 của Sở Tài nguyên và Môi trường tỉnh Hà Tĩnh về các địa điểm ô nhiễm thuốc bảo vệ thực vật, địa điểm thử nghiệm mô hình xử lý đất ô nhiễm Lindane được lựa chọn tại vườn nhà ông Trần Văn H., xã Việt Xuyên, tỉnh Hà Tĩnh (tọa độ $18^{\circ}23'39''\text{B}$, $105^{\circ}47'57''\text{Đ}$). Kết quả phân tích cho thấy nồng độ Lindane tồn dư trong đất là 11,5 ppm. Lô đất có diện tích khoảng 0,2 ha, trước đây từng có một kho thuốc bảo vệ thực vật nay đã bị phá dỡ. Do nền kho thấp hơn khu vực xung quanh, nên thường xuyên ngập úng và cũng để tránh mùi nên gia đình đã lấp một lớp đất mới cao tầm 1m lên trên bề mặt. Mặc dù vậy, theo phản ánh thì sau khi trời mưa và có nắng thì mùi thuốc vẫn còn rất nồng nặc, nguồn nước bị ô nhiễm và có ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe, với nhiều hộ có người mắc bệnh ung thư. Gia đình ông Hải cũng đã có người thân qua đời vì bệnh này. Do lo ngại về hóa chất tồn dư, cả gia đình đã chuyển đi nơi khác sinh sống.

Mô hình được triển khai trực tiếp ngoài thực địa với 02 lô là lô thí nghiệm có xử lý theo quy trình đã xây dựng và lô đối chứng giữ nguyên hiện trạng (Hình 2.3). Dựa trên trao đổi với gia đình và địa phương, phần đất ô nhiễm được chôn lấp dưới lớp đất sâu 1m. Do đó, trước hết phần đất phủ ở trên với độ dày 1m được mức lên rồi mới tiến hành xử lý theo quy trình.



Hình 2.3. Bố trí mô hình xử lý đất ô nhiễm Lindane

Ghi chú: ĐC: Vị trí lấy mẫu ở lô đối chứng; TN1 và TN2: Vị trí lấy mẫu 1 và 2 ở lô thí nghiệm

Lô thí nghiệm được tiến hành xử lý như sau: Đầu tiên, khoảng 1 m đất bề mặt được đào lên và chuyển sang khu vực rìa lô thí nghiệm hoặc sân nhà cũ để giải phóng mặt bằng. Sau đó, theo quy trình xử lý, phần đất cần cải tạo phải được cày xới đến độ sâu khoảng 100 cm nhằm tạo điều kiện trộn đều chế phẩm. Công đoạn này được thực hiện bằng máy xúc để đảm bảo độ sâu và độ đồng nhất của đất. Chế phẩm có hiệu quả phân giải Lindane tốt nhất được lựa chọn được bổ sung vào đất đã xử lý sơ bộ theo tỷ lệ 1% khối lượng bằng cách rải đều, sau đó trộn đều đất với chế phẩm bằng máy xúc. Kết quả đo độ ẩm tại hiện trường cho thấy đất đạt mức 70%, đúng với yêu cầu trong quy trình nên không cần bổ sung thêm nước. Để tiến hành bước bổ sung phụ gia, dung dịch Tween 80 được pha loãng trong 10 m³ nước. Dung dịch sau khi hòa tan hoàn toàn được tưới đều lên bề mặt lớp đất đã trộn chế phẩm sinh học (với lượng nước trên trong dung dịch cho toàn bộ khối đất xử lý thì không ảnh hưởng đáng kể đến độ ẩm của đất). Toàn bộ đất đã được xử lý được đảo trộn kỹ một lần nữa bằng máy xúc để đảm bảo chế phẩm và dung dịch phụ gia phân bố đồng đều trong toàn khối đất. Cuối cùng, lớp đất bề mặt bên trên được trả lại mặt bằng. Sau khi tiến hành theo quy trình đã xây dựng, mẫu đất ở lô thí nghiệm sẽ được lấy mẫu và phân tích nồng độ Lindane vào thời

điểm 0, 6 tuần và 12 tuần. Đất ở lô đối chứng được lấy mẫu và phân tích ở thời điểm cuối là 12 tuần.

2.3.5 Phân tích hóa học nhằm đánh giá khả năng phân giải DDT và Lindane

2.3.5.1 Phương pháp đánh giá khả năng sinh enzyme loại chloride

Phương pháp này được xây dựng dựa trên phương pháp của Bergmann và cộng sự [22] và tiến hành theo các bước sau: Dịch huyền phù cần phân tích được tiếp giống 10% vào các ống nghiệm chứa lần lượt MSM, MSM bổ sung 30 ppm DDT hoặc 50 ppm Lindane (tùy chủng có hoạt tính phân giải gì), nuôi lắc 7 ngày, ở tốc độ 150 vòng/phút, ở 30°C. Sau 7 ngày, hút 200μL dịch nuôi lắc sang một giếng trên đĩa 96-giếng, bổ sung 20μL dung dịch 0,25M Ferric ammonium sulfate $[\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ trong 9M Nitric acid và 20μL dung dịch bão hòa Mercuric thiocyanate trong Ethanol. Trộn đều hỗn hợp và quan sát sự thay đổi màu sắc (vàng dần nếu có chloride tự do). Sau 10 phút, đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 460nm bằng máy đo quang phổ. Mẫu trắng (blank) và mẫu để dựng đường chuẩn chứa nồng độ NaCl khác nhau (0,2,5,10,30,50 mg/L) được xử lý tương tự. Lượng chloride bị loại từ DDT hay Lindane ra môi trường được tính bằng hiệu số lượng chloride giữa mẫu phân tích và mẫu đối chứng.

2.3.5.2 Phương pháp phân tích DDT và Lindane bằng GC-FID

Đối với các mẫu phân tích DDT được định lượng bằng GC-FID theo theo Pant và cộng sự (2013) [146]: phần dịch chiết bằng chloroform (được chiết với tỷ lệ thể tích 1:1) được phân tích bằng máy GC (Agilent 7890). Điều kiện phân tích được thiết lập như sau: sử dụng cột mao quản thủy tinh HP-5 (đường kính trong 0,32 mm, chiều dài 30 m, độ dày lớp phim 0,2 μm); khí mang là nitơ (N_2) với tốc độ dòng 1,2 mL/phút; chế độ tiêm mẫu chia dòng với tỷ lệ 1:10; thể tích tiêm mẫu là 1 μL. Chương trình nhiệt độ được cài đặt gồm: nhiệt độ buồng tiêm 250°C; nhiệt độ lò cột ban đầu 170°C, giữ trong 5 phút, sau đó tăng với tốc độ 35°C/phút đến 275°C và duy trì trong 5 phút. Nhiệt độ đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID) được đặt ở 275°C. Kết quả thực nghiệm cho thấy đỉnh sắc ký đặc trưng của DDT xuất hiện ổn định tại thời gian lưu khoảng 10,4 phút. Đường chuẩn được xây dựng riêng cho từng đợt phân tích dựa trên tín hiệu thu được từ các mẫu chuẩn có nồng độ DDT khác nhau. Cụ thể, đối với mẫu dịch chiết từ môi trường lỏng, các dung dịch MSM (1 mL/mẫu) chứa DDT ở nồng độ 10, 30 và 50 ppm được sử dụng. Trong trường hợp phân tích dịch chiết từ môi trường rắn hoặc bán rắn, các khối

thạch MSM (1 cm³/mẫu) chứa DDT ở các nồng độ tương ứng được dùng để thiết lập đường chuẩn.

Đối với mẫu cần phân tích Lindane theo các công bố trước đây có thể được định lượng bằng GC-MS theo Manickam và cộng sự (2007) [144] sau khi được tách chiết bằng các dung môi hexane, acetone và ethyl acetate theo Manickam và cộng sự (2008) [145]. Tuy nhiên, trên thực tế thử nghiệm chúng tôi nhận thấy quy trình tương tự sử dụng GC-FID cũng giúp định lượng Lindane một cách hiệu quả. Do đó, chúng tôi sử dụng GC-FID để phân tích Lindane với quy trình như sau: mẫu (dịch chiết n-hexane sau khi chiết với tỷ lệ thể tích 1:1) được phân tích bằng máy GC (Agilent 7890). Điều kiện vận hành cụ thể như sau: cột mao quản thủy tinh HP-5 (đường kính trong 0,32 mm, chiều dài 30 m, độ dày lớp phim 0,2 µm); khí mang là nitơ (N₂) với tốc độ dòng 1,2 mL/phút. Mẫu được tiêm ở chế độ chia dòng với tỷ lệ chia 1:10, thể tích tiêm mẫu là 1 µL. Nhiệt độ buồng tiêm được duy trì ở 250 °C. Chương trình nhiệt độ của lò cột được thiết lập như sau: nhiệt độ ban đầu 180°C, giữ trong 5 phút, sau đó tăng với tốc độ 30°C/phút đến 300°C và giữ trong 3 phút. Nhiệt độ đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID) được cài đặt ở 300°C. Kết quả thực nghiệm cho thấy đỉnh sắc ký của Lindane xuất hiện ổn định tại thời gian lưu khoảng 6,8–6,9 phút. Đường chuẩn được xây dựng cho từng lần phân tích dựa trên tín hiệu thu được từ các mẫu chuẩn có nồng độ Lindane khác nhau. Cụ thể, đối với mẫu dịch chiết từ môi trường lỏng, các dung dịch MSM (1 mL/mẫu) chứa Lindane ở các nồng độ 10, 50 và 100 ppm được sử dụng. Đối với mẫu dịch chiết từ môi trường rắn hoặc bán rắn, các khối thạch MSM (1 cm³/mẫu) chứa Lindane với nồng độ 10, 30, 50 và 100 ppm được dùng để xây dựng đường chuẩn.

2.3.5.3 Phương pháp phân tích DDT và Lindane bằng GC-MS

Do mẫu đất có các thành phần phức tạp có thể ảnh hưởng đến độ chính xác của phương pháp phân tích bằng GC-FID nên chúng tôi sử dụng GC-MS để phân tích DDT và Lindane trong các mẫu đất. Phương pháp xây dựng dựa trên EPA8270 (Hiệp hội Bảo vệ môi trường – EPA, Hoa Kỳ). Mỗi mẫu đất được chiết bằng n-hexane theo tỷ lệ (thể tích) 1 mẫu : 1 n-hexane (vortex trong 30 giây, sau đó ly tâm 6000 vòng/ phút trong 5 phút, thu dịch trên). Phần dịch chiết được phân tích bằng máy GC (Agilent 7890), với điều kiện vận hành cụ thể như sau: cột glass capillary HP5-MS (đường kính trong 0,25 mm, chiều dài 30 m, độ dày lớp phim 0,25

µm; mã cột 19091S-433); khí mang là heli với tốc độ dòng 1,0 mL/phút; chế độ tiêm mẫu chia dòng với tỷ lệ chia 1:20; thể tích tiêm mẫu là 1 µL. Chương trình nhiệt độ được thiết lập như sau: nhiệt độ buồng tiêm 280°C; nhiệt độ lò cột ban đầu 80°C, giữ trong 1 phút, sau đó tăng với tốc độ 40°C/phút đến 300°C và giữ trong 1,7 phút; giai đoạn chạy sau (post-run) ở 300 °C trong 0,5 phút. Hệ thống khối phổ (MS, model 5977C GC/MSD) được vận hành với các thông số: nhiệt độ đường truyền MSD 300 °C, nhiệt độ nguồn ion 230 °C, nhiệt độ bộ tứ cực (quadrupole) 150 °C, thời gian trễ dung môi (solvent delay) là 4,5 phút. Nồng độ các hợp chất và sản phẩm chuyển hóa được xác định bằng phần mềm MassHunter, đồng thời các chất phân tích được nhận diện dựa trên việc so sánh phổ khối với thư viện chuẩn NIST.

2.3.6 Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn đều được nuôi và giữ trên môi trường LB còn các chủng xạ khuẩn thì trên môi trường YS.

Khi làm thí nghiệm kiểm tra mật độ vi khuẩn, chúng tôi tiến hành pha loãng mẫu cần kiểm tra với dung dịch NaCl 0,9% đã khử trùng rồi cấy trải trên đĩa thạch LB với vi khuẩn hoặc YS thạch với xạ khuẩn, và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24 – 48h.

Số lượng khuẩn lạc trên thạch được đếm và mật độ vi khuẩn có trong 1ml mẫu dịch thí nghiệm được tính theo công thức [8]:

$$M_i(\text{CFU/ml}) = A_i \times \frac{D_i}{V}$$

Trong đó: M_i : Số lượng tế bào có trong mẫu

A_i : Số khuẩn lạc trung bình trên một đĩa

D_i : Độ pha loãng của dịch được cấy

V : Dung tích huyền phù tế bào cho vào mỗi đĩa (ml)

2.3.7 Phương pháp lấy mẫu đất ngoài thực tế

Việc lấy mẫu đất tại hiện trường được thực hiện theo TCVN 7538-1:2006 phần 1, TCVN 7538-2:2005 phần 2 và TCVN 7538-3:2005 phần 3 (theo quy định của QCVN 54-2013-BTNMT). Mẫu được thu bằng khoan tay ở độ sâu 0,1-0,2 m của lớp đất nghi ngờ ô

nhiễm. Ở mỗi vị trí lấy mẫu, đất được lấy 3 lần và trộn vào nhau thành một mẫu đồng nhất, đựng và bảo quản trong túi zip plastic bạc (không hấp phụ DDT và Lindane) ở nhiệt độ 10-20°C. Trong quá trình thu mẫu, người thực hiện đi ủng hoặc giày đế cứng, đeo găng tay và khẩu trang. Mẫu đất sau khi lấy về được lọc bằng rây nhằm loại bỏ đá vụn, sỏi, giữ lại các hạt đất mịn và sấy ở nhiệt độ 80°C đến khi khối lượng không đổi, sau đó sẽ được phân tích nồng độ DDT và Lindane bằng máy GC-MS (trình bày ở mục 2.3.6.3).

2.3.8 Phân tích và xử lý số liệu

Các thí nghiệm đều được lặp lại 2-3 lần tùy thí nghiệm. Các giá trị trung bình, sai số ở dạng độ lệch chuẩn và các phân tích thống kê đều được tính toán bằng cách sử dụng các phương pháp thống kê cơ bản với các công cụ trong Microsoft Excel. Ý nghĩa của sự khác biệt giữa các dữ liệu được đánh giá bằng phân tích t-Test; sai số giữa các lần lặp lại được thể hiện dưới dạng độ lệch chuẩn.

Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Excel và GraphPad Prism 9.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân tích hệ gen để xây dựng tổ hợp chủng giúp phân giải hiệu quả DDT và Lindane

3.1.1 Kết quả WGS của các đơn chủng vi sinh vật

3.1.1.1 Tách DNA và giải trình tự

Trong các nghiên cứu trước đây chúng tôi đã thu thập được bộ chủng gồm 10 chủng có khả năng phân giải hiệu quả Lindane và 10 chủng có khả năng phân giải hiệu quả DDT [2, 9, 115]. Nhằm mục đích tạo tổ hợp chủng phân giải hiệu quả DDT và Lindane, trước hết chúng tôi phân tích hệ gen của các chủng để phân tích và dự đoán sự tương tác giữa các chủng về khả năng phân giải DDT và Lindane.

DNA tổng số của 10 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải DDT hiệu quả (*Streptomyces marianii* DDT21, *Streptomycesnojiriensis* DDT23, *Pseudomonas* sp. nov. T006, *Pseudomonas nitroreducens* Y077, *Stenotrophomonas maltophilia* Y042, *Pseudomonas lalkuanensis* PAM64, *Pseudomonas anuradhasurensis* PAM67, *Cupriavidus metallidurans* TN030, *Stenotrophomonas maltophilia* Y050, *Pseudomonas putida* T087) và 10 chủng phân giải Lindane hiệu quả (*Streptomyces wuyuanensis* LD02, *Streptomyces katrae* A119, *Pseudomonas putida* PAM65, *Pseudomonas putida* PAM66, *Stenotrophomonas maltophilia* Y050, *Sphingobacterium mizutaii* Y027, *Sphingobacterium multivorum* Y049, *Sphingobacterium multivorum* Y052, *Pseudomonas putida* T069, *Pseudomonas kribbensis* Y076) đã được tách chiết thành công và đạt tiêu chuẩn chất lượng để tiến hành giải trình tự WGS. Đây là những chủng được tuyển chọn có khả năng phân giải hiệu quả DDT và Lindane cùng khả năng thích tốt với các điều kiện môi trường khác nhau [2, 9, 115].

Kết quả phân tích chất lượng bằng công cụ FastQC cho thấy tất cả các mẫu đều có điểm chất lượng tốt (điểm chất lượng trung bình vượt ngưỡng 30). Dữ liệu này sau đó được làm sạch bằng công cụ Fastq là các trình tự sau tinh sạch vẫn giữ lại hơn 90% dữ liệu gốc. Phân tích sơ bộ bằng Kraken2 cho thấy các mẫu có độ tinh khiết cao, trong khi đánh giá toàn vẹn hệ gen bằng BUSCO cho thấy tất cả các chủng đều đạt chỉ số toàn vẹn trên 98% (Phụ lục 2). Kết quả định danh dựa trên dữ liệu WGS bằng Kraken2 (Phụ lục 2) phù hợp với kết quả

định danh trước đó của nhóm nghiên cứu, qua đó khẳng định lại tính chính xác của kết quả phân loại các chủng vi sinh vật được nghiên cứu.

Hệ gen sau đó được lắp ráp bằng công cụ SPAdes với các tham số mặc định. Các contig có kích thước dưới 500 bp được loại bỏ khỏi bản lắp ráp. Kết quả lắp ráp này được đánh giá bởi phần mềm QUAST. Để kiểm tra lại contig đã lắp ráp, các contig đã lắp ráp được BLAST lên cơ sở dữ liệu NCBI. Kết quả lắp ráp hệ gen cuối cùng, sau khi đã loại lọc bỏ nhiễm được thể hiện trong (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Thống kê hệ gen lắp ráp sau khi lọc các mẫu

STT	Mẫu	Số contig (contig)	Contig lớn nhất (bp)	Kích thước hệ gen (Mbp)	GC (%)	N50
1	PAM64	46	765256	6,11	64,11	336778
2	PAM67	814	996350	5,83	62,60	395688
3	Y042	40	531237	4,34	66,71	249630
4	Y077	29	630507	6,3	64,91	445647
5	T006	28	857778	6,47	65,79	558527
6	T087	73	612566	5,43	63,49	137337
7	DDT21	42	1451334	10,43	71,04	542130
8	DDT23	114	556889	8,60	73,24	171071
9	TN030	1526	541903	7,78	62,72	157628
10	PAM65	57	565465	5,69	63,05	248422
11	PAM66	64	589144	5,78	63,02	195110
12	Y076	241	519919	6,40	60,07	237665
13	Y027	68	426089	4,64	39,88	146232
14	A119	833	111026	8,51	72,79	19104
15	T069	77	721707	6,44	59,44	218233
16	Y049	675	266696	6,26	40,51	83493
17	Y052	159	205542	5,85	40,00	74028
18	LD02	76	547821	7,87	72,12	222702
19	Y050	53	538385	4,34	66,72	151015

Các kết quả về kích thước hệ gen và tỷ lệ GC của hệ gen sau lắp ráp là phù hợp với các kích thước hệ gen của các chủng đại diện các chi tương ứng được công bố trên NCBI. Do đó, những hệ gen lắp ráp này có độ tin cậy cao và sẽ được sử dụng trong những bước phân tích tiếp theo.

3.1.1.2 Chú giải hệ gen và bản đồ chuyển hóa KEGG

Kết quả đánh giá độ toàn vẹn của các hệ gen bằng phần mềm BUSCO (Bảng 3.2) cho thấy tất cả các hệ gen đều có độ toàn vẹn cao, với tỷ lệ toàn vẹn BUSCO đạt trên 98,0%.

Bảng 3.2. Kết quả dự đoán và độ toàn vẹn của hệ gen của các mẫu

STT	Mẫu	CDS	rRNA	tmRNA	tRNA	Tỷ lệ toàn vẹn BUSCO
1	PAM64	5562	3	1	59	99,6%
2	PAM67	5116	4	1	56	99,8%
3	Y042	3890	5	1	67	99,8%
4	Y077	5675	1	1	60	100%
5	T006	5869	5	1	51	99,6%
6	T087	4838	2	1	61	99,7%
7	DDT21	9279	3	1	91	100%
8	DDT23	7668	3	1	103	100%
9	TN030	6204	4	1	60	100%
10	PAM65	5114	3	1	59	99,9%
11	PAM66	5153	5	1	58	99,9%
12	Y076	5656	5	1	66	99,7%
13	Y027	3977	5	1	39	98,1%
14	A119	7765	3	1	95	100%
15	T069	5772	3	1	60	99,2%
16	Y049	5480	6	1	70	98%
17	Y052	5126	5	1	68	98,7%
18	LD02	6855	1	1	88	100%
19	Y050	3888	2	1	58	99,2%

Các hệ gen sau khi được lắp ráp được chú giải chức năng bằng phần mềm Prokka. Kết quả dự đoán và phân loại chức năng protein theo nhóm COG (Bảng 3.3 và 3.4) cho thấy thành phần các nhóm protein chức năng của các chủng khác nhau có sự tương đồng khá cao. Tuy nhiên, một tỷ lệ đáng kể protein được phát hiện không xác định rõ chức năng (thuộc nhóm S) hoặc chưa được phân loại vào bất kỳ nhóm COG nào, chiếm khoảng 14–19% và 4–14% tổng số protein, tương ứng. Trong số này cũng có thể có những protein liên quan đến khả năng phân giải DDT và Lindane. Ngoài ra, đối với nhóm chủng có khả năng phân giải Lindane, đáng chú ý là hai chủng xạ khuẩn A119 và LD02 có số lượng protein liên quan đến quá trình chuyển hóa carbohydrate cao hơn so với các vi khuẩn còn lại. Điều này phản ánh khả năng trao đổi chất mạnh mẽ của xạ khuẩn và cho thấy tiềm năng hỗ trợ các vi khuẩn khi được sử dụng phối hợp trong các tổ hợp chủng.

Bảng 3.3. Kết quả dự đoán và phân loại chức năng protein theo nhóm COG các chủng có khả năng phân giải DDT

Ghi chú: *Str.m.*: *Streptomyces marianii*; *Str.n.*: *Streptomycesnojiriensis*; *P.l.*: *Pseudomonas lalkuanensis*; *P.a.*: *Pseudomonas anuradhapurensis*; *P. nov.*: *Pseudomonas sp. nov.*; *P.p.*: *Pseudomonas putida*; *C.m.*: *Cupriavidus metallidurans*; *S.m.*: *Stenotrophomonas maltophilia*; *P.n.*: *Pseudomonas nitroreducens*

Ký hiệu nhóm COG	Chức năng của nhóm chức theo KEGG	<i>Str.m.</i> DDT21	<i>Str.n.</i> DDT23	<i>P.l.</i> PAM64	<i>P.a.</i> PAM67	<i>P. nov</i> T006	<i>P.p.</i> T087	<i>C.m.</i> TN030	<i>S.m.</i> Y042	<i>S.m.</i> Y050	<i>P.n.</i> Y077
A	Quá trình xử lý và biến đổi RNA	5	5	1	1	2	1	0	2	2	2
B	Cấu trúc và động học của nhiễm sắc chất	3	3	4	2	6	3	3	1	1	5
C	Sản xuất và chuyển hóa năng lượng	521	401	378	345	382	350	538	207	207	388
D	Kiểm soát chu kỳ tế bào, phân chia tế bào, và phân chia nhiễm sắc thể	87	91	52	52	51	50	55	41	41	48
E	Vận chuyển và chuyển hóa axit amin	827	667	583	458	595	446	456	267	267	575
F	Vận chuyển và chuyển hóa nucleotide	170	177	118	152	126	143	129	85	85	119
G	Vận chuyển và chuyển hóa cacbohydrate	908	442	189	232	242	200	225	162	162	233
H	Vận chuyển và chuyển hóa coenzyme	233	246	182	212	199	198	197	122	122	184
I	Vận chuyển và chuyển hóa lipid	483	366	291	168	309	168	310	145	145	310
J	Dịch mã, cấu trúc ribosome và sự hình thành ribosome	257	267	211	239	222	219	205	197	197	221

Ký hiệu nhóm COG	Chức năng của nhóm chức theo KEGG	<i>Str.m.</i> DDT21	<i>Str.n.</i> DDT23	<i>P.l.</i> PAM64	<i>P.a.</i> PAM67	<i>P. nov</i> T006	<i>P.p.</i> T087	<i>C.m.</i> TN030	<i>S.m.</i> Y042	<i>S.m.</i> Y050	<i>P.n.</i> Y077
K	Phiên mã	1072	901	516	453	575	464	579	272	272	557
L	Sao chép, tái tổ hợp và sửa chữa DNA	346	333	190	169	150	162	257	136	137	150
M	Sinh tổng hợp thành tế bào, màng và vỏ tế bào	418	305	274	335	335	307	372	274	274	307
N	Khả năng di động của tế bào	52	37	154	126	185	122	148	124	123	173
O	Biến đổi sau dịch mã, luân chuyển và điều hòa protein (chaperones)	243	200	167	146	165	132	175	138	138	169
P	Vận chuyển và chuyển hóa ion vô cơ	390	337	320	362	424	346	405	220	220	381
Q	Sinh tổng hợp, vận chuyển và dị hóa các chất chuyển hóa thứ cấp	378	375	198	135	202	127	225	89	89	197
R	Dự đoán chức năng chung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	Chưa xác định chức năng	1332	1164	1113	967	1166	909	1145	759	759	1129
T	Cơ chế truyền tín hiệu	554	466	351	284	374	256	237	218	217	363
U	Vận chuyển nội bào, bài tiết và vận chuyển túi tiết	99	90	169	111	168	116	197	159	159	154
V	Cơ chế phòng vệ	201	162	66	51	63	53	58	69	69	67
W	Cấu trúc ngoại bào	1	1	0	0	1	0	0	4	4	1
Y	Cấu trúc nhân tế bào	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	Khung xương tế bào (bộ xương tế bào)	4	9	1	0	2	0	4	3	3	2
Chưa được phân loại		1157	1059	326	287	305	276	389	282	282	294

Bảng 3.4. Kết quả dự đoán và phân loại chức năng protein theo nhóm COG các chủng có khả năng phân giải Lindane

Ghi chú: *Str.k.*: *Streptomyces katrae*; *Str.w.*: *Streptomyces wuyuanensis*; *P.p.*: *Pseudomonas putida*; *P.k.*: *Pseudomonas kribbensis*; *Sph.mi.*:

Sphingobacterium mitazuii; *Sph.mu.*: *Sphingobacterium multivorum*; *S.m.*: *Stenotrophomonas maltophilia*

Ký hiệu nhóm COG	Chức năng của nhóm chức theo KEGG	<i>Str.k.</i> A119	<i>Str.w.</i> LD02	<i>P.p.</i> T069	<i>P.p.</i> PAM65	<i>P.p.</i> PAM66	<i>P.k.</i> Y076	<i>Sph.mi.</i> Y027	<i>Sph.mu.</i> Y049	<i>Sph.mu.</i> Y052	<i>S.m.</i> Y050
A	Quá trình xử lý và biến đổi RNA	5	3	0	1	1	1	0	0	0	2
B	Cấu trúc và động học của nhiễm sắc chất	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1
C	Sản xuất và chuyển hóa năng lượng	397	367	372	378	387	339	212	239	226	207
D	Kiểm soát chu kỳ tế bào, phân chia tế bào, và phân chia nhiễm sắc thể	86	87	57	54	50	60	35	35	29	41
E	Vận chuyển và chuyển hóa axit amin	600	597	523	446	477	486	257	316	296	267
F	Vận chuyển và chuyển hóa nucleotide	149	126	136	147	144	155	78	104	88	85
G	Vận chuyển và chuyển hóa cacbohydrate	430	440	268	218	228	260	234	352	331	162
H	Vận chuyển và chuyển hóa coenzyme	222	199	205	201	203	211	159	173	168	122
I	Vận chuyển và chuyển hóa lipid	315	338	274	210	207	218	106	137	128	145
J	Dịch mã, cấu trúc ribosome và sự hình thành ribosome	258	248	219	218	221	228	176	207	189	197
K	Phiên mã	837	714	541	466	472	504	231	394	366	272
L	Sao chép, tái tổ hợp và sửa chữa DNA	362	326	160	171	168	163	173	220	209	137

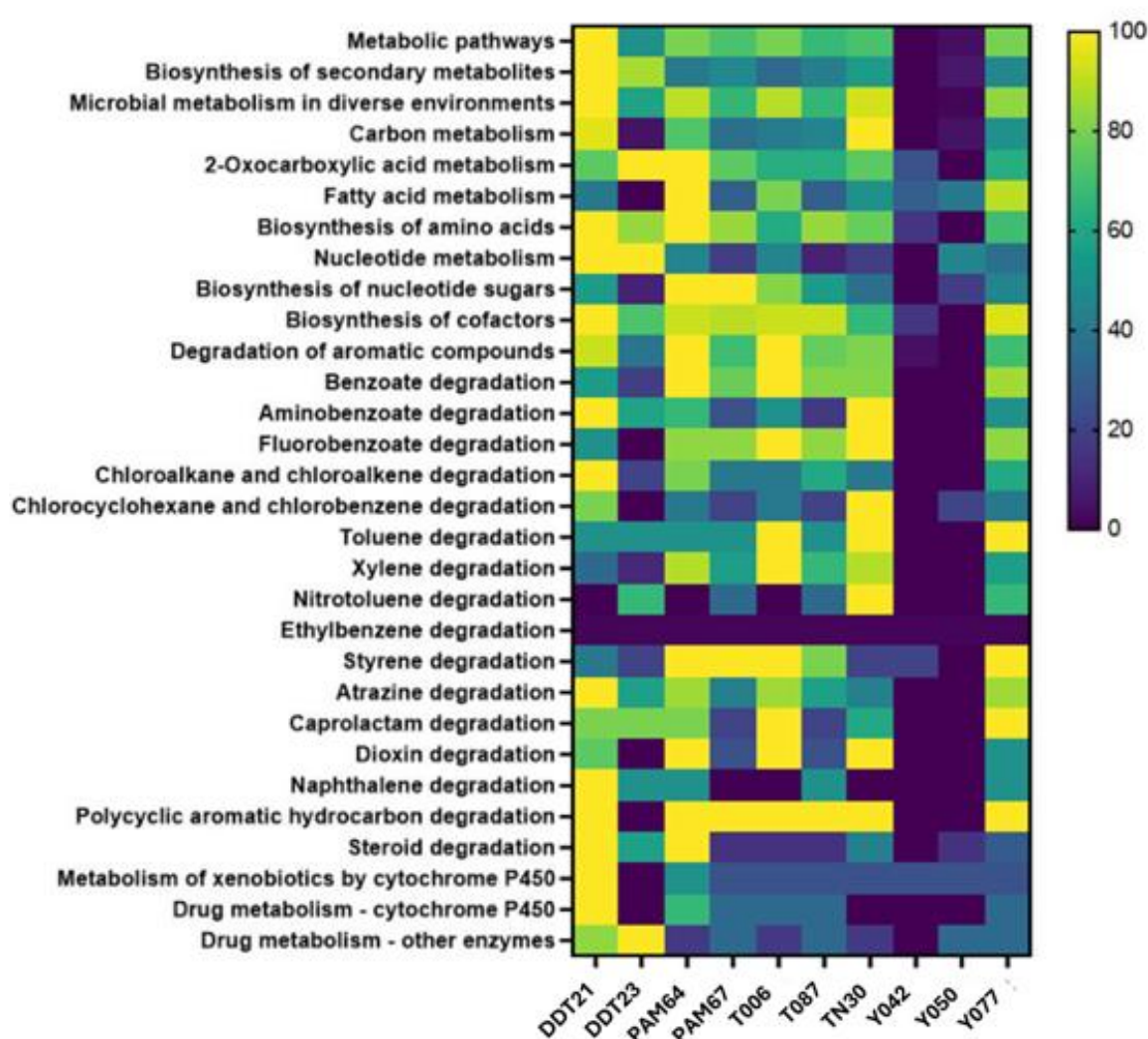
Ký hiệu nhóm COG	Chức năng của nhóm chức theo KEGG	<i>Str.k.</i> A119	<i>Str.w.</i> LD02	<i>P.p.</i> T069	<i>P.p.</i> PAM65	<i>P.p.</i> PAM66	<i>P.k.</i> Y076	<i>Sph.mi.</i> Y027	<i>Sph.mu.</i> Y049	<i>Sph.mu.</i> Y052	<i>S.m.</i> Y050
M	Sinh tổng hợp thành tế bào, màng và vỏ tế bào	304	299	330	311	319	339	273	349	338	274
N	Khả năng di động của tế bào	25	28	160	113	113	147	17	21	17	123
O	Biến đổi sau dịch mã, luân chuyển và điều hòa protein (chaperones)	189	214	160	130	129	156	114	164	154	138
P	Vận chuyển và chuyển hóa ion vô cơ	318	317	412	381	389	394	262	352	339	220
Q	Sinh tổng hợp, vận chuyển và dị hóa các chất chuyển hóa thứ cấp	338	281	188	146	143	162	57	71	67	89
R	Dự đoán chức năng chung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	Chưa xác định chức năng	1133	1096	1130	1002	1007	1127	736	960	920	759
T	Cơ chế truyền tín hiệu	464	444	317	292	290	325	136	229	216	217
U	Vận chuyển nội bào, bài tiết và vận chuyển túi tiết	82	76	178	107	109	181	82	96	95	159
V	Cơ chế phòng vệ	141	142	52	55	56	60	71	106	98	69
W	Cấu trúc ngoại bào	1	1	0	0	0	0	0	2	2	4
Y	Cấu trúc nhân tế bào	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	Khung xương tế bào (bộ xương tế bào)	13	6	0	0	0	1	1	1	1	3
Chưa được phân loại		1036	812	358	294	306	407	287	423	410	282

Hai nhóm con đường được sử dụng để đánh giá khả năng chuyển hóa chung và khả năng phân giải DDT và Lindane của các đơn chủng lần lượt là “Global and overview maps” (các con đường trao đổi chất chung) và “Xenobiotics biodegradation and metabolism” (các con đường chuyển hóa và phân giải các chất khó phân hủy). Để so sánh mức độ phong phú các enzyme có trong những con đường trao đổi chất thuộc vào hai nhóm con đường này của các đơn chủng, bản đồ heatmap được vẽ dựa vào số lượng enzyme có trong các con đường chuyển hóa (Hình 3.1 và Hình 3.3).

Các con đường trao đổi chất được thể hiện một cách trực quan ở các dạng bản đồ trao đổi chất khác nhau trong CSDL KEGG. Bản đồ “map01120: Microbial metabolism in diverse environments” được lựa chọn trong nghiên cứu này để phân tích các con đường trao đổi chất dựa vào các enzyme chú giải từ genome của các chủng, do đây là bản đồ trao đổi chất tổng quát duy nhất có chứa các con đường liên quan đến DDT và Lindane

Xét 10 chủng có khả năng phân giải DDT, có thể thấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces marianii* DDT21 có số lượng enzyme trong các con đường trao đổi chất là đa dạng nhất. Cụ thể, chủng này có 848 enzyme thuộc nhóm “Metabolic pathways”, 341 enzyme thuộc nhóm “Biosynthesis of secondary metabolites” và 257 enzyme thuộc nhóm “Microbial metabolism in diverse environments”, cao nhất trong số các chủng khảo sát (Hình 3.1, phụ lục 3). Chủng *Cupriavidus metallidurans* TN030 cũng đáng được lưu ý vì có số lượng enzyme cao nhất ở hai con đường liên quan trực tiếp đến phân giải các hợp chất chứa chlorine, gồm 6 enzyme ở con đường là “Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation” và 4 enzyme ở con đường “Dioxin degradation”. Đối với các chủng *Pseudomonas* sp. (PAM64, PAM67, T006, T087 và Y077), mặc dù nhìn chung các con đường “global metabolic pathways” của chúng có vẻ ít đa dạng hơn so với DDT21, nhưng các con đường phân hủy xenobiotics của chúng lại đa dạng hơn so với DDT21 và có thể được coi là tương tự như TN030 (con đường “chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation” của các chủng PAM64, PAM67, T006, T087 và Y077 lần lượt là 3,2,3,2 và 3). Có thể thấy rằng các chủng *Pseudomonas* sp. này rất giống nhau về các con đường chuyển hóa, đặc biệt là các con đường liên quan đến quá trình phân hủy các xenobiotics như chlorideroalkane, chlorideroalkene, chlorocyclohexane, chloriderobenzen, benzoate và toluene, có liên quan đến quá trình phân hủy DDT. Đáng chú ý, hai chủng là *Pseudomonas lalkuanensis* PAM64 và *Pseudomonas* sp. nov T006 mang nhiều con đường phân hủy

dioxin và con đường phân hủy xylene hơn. Những quan sát này cho thấy hai chủng này có khả năng phân hủy DDT linh hoạt và hiệu quả hơn so với các chủng *Pseudomonas* khác. Ngược lại, hai chủng *Stenotrophomonas* sp. (Y042 và Y050) dường như có số lượng con đường “global metabolic pathways” cũng như con đường phân hủy xenobiotics ít nhất (Phụ lục 3). Tuy nhiên, chúng sở hữu một số gen mã hóa một số enzyme mà các chủng *Pseudomonas* kia không có, chẳng hạn như carboxymethylenebutenolidase và haloalkane dehalogenase (chỉ có ở *Stenotrophomonas maltophilia* Y050) (Phụ lục 4). Có lẽ, những enzyme này phần nào khiến hai chủng *Stenotrophomonas* trở nên độc đáo trong bức tranh tổng quát về phân hủy sinh học DDT.



Hình 3.1. Bản đồ heatmap so sánh độ phong phú tương đối trong số lượng enzyme ở một số con đường trao đổi chất ở các đơn chủng phân giải DDT trong nghiên cứu.

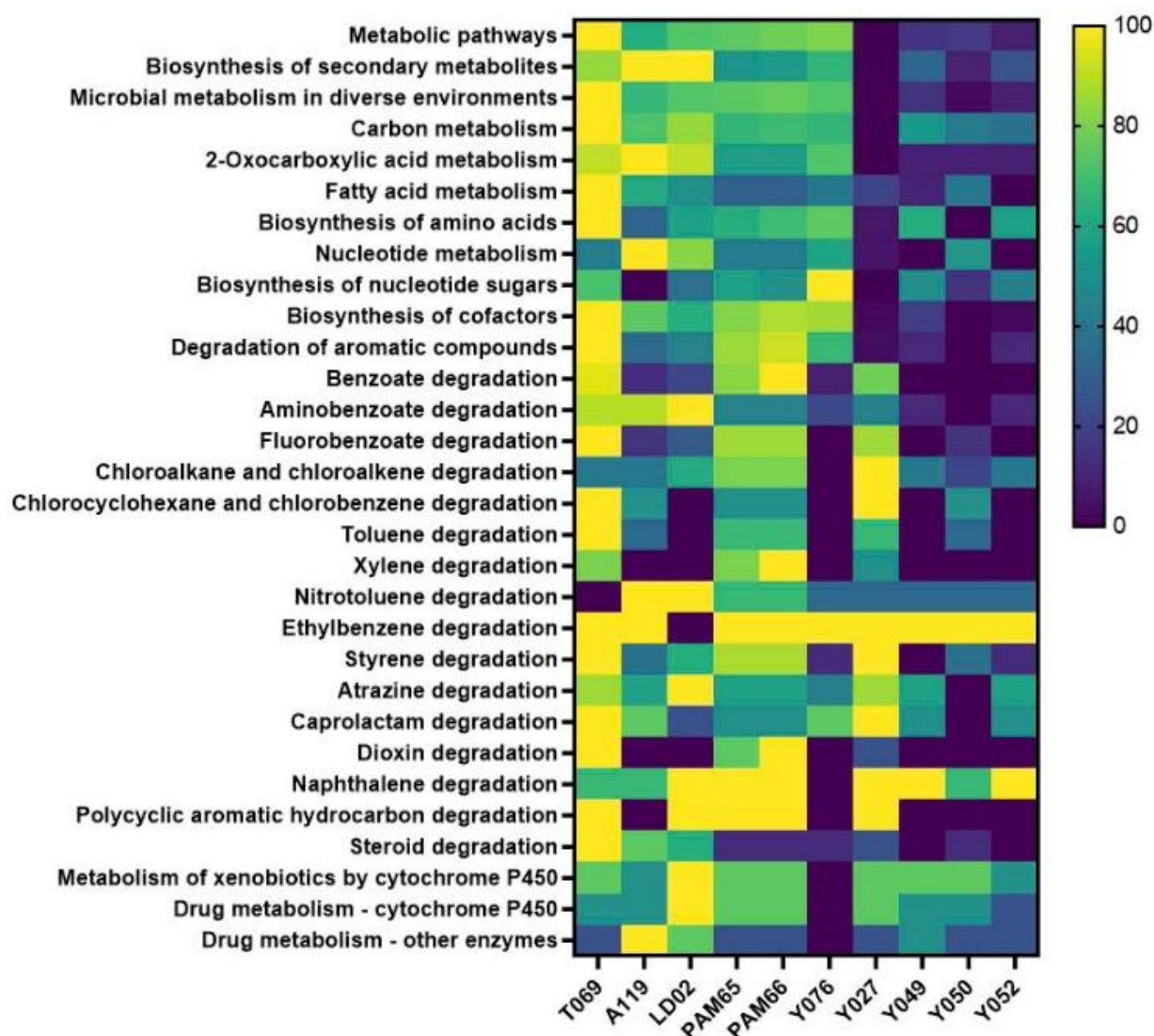
Ghi chú: Giá trị lớn nhất trong mỗi nhóm được tính là 100%, giá trị bé nhất được tính là 0%.



Hình 3.2. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của một số đơn chủng phân giải DDT trong nghiên cứu.

Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Xét 10 chủng có khả năng phân giải Lindane, có thể thấy hầu hết các chủng nghiên cứu đều có các con đường trao đổi chất cơ bản khá toàn vẹn. Trong đó, bốn chủng *Pseudomonas* sp. (T069, PAM65, PAM66 và Y076) có lượng enzyme phong phú nhất trong số các chủng được chọn (Hình 3.3, Phụ lục 5).

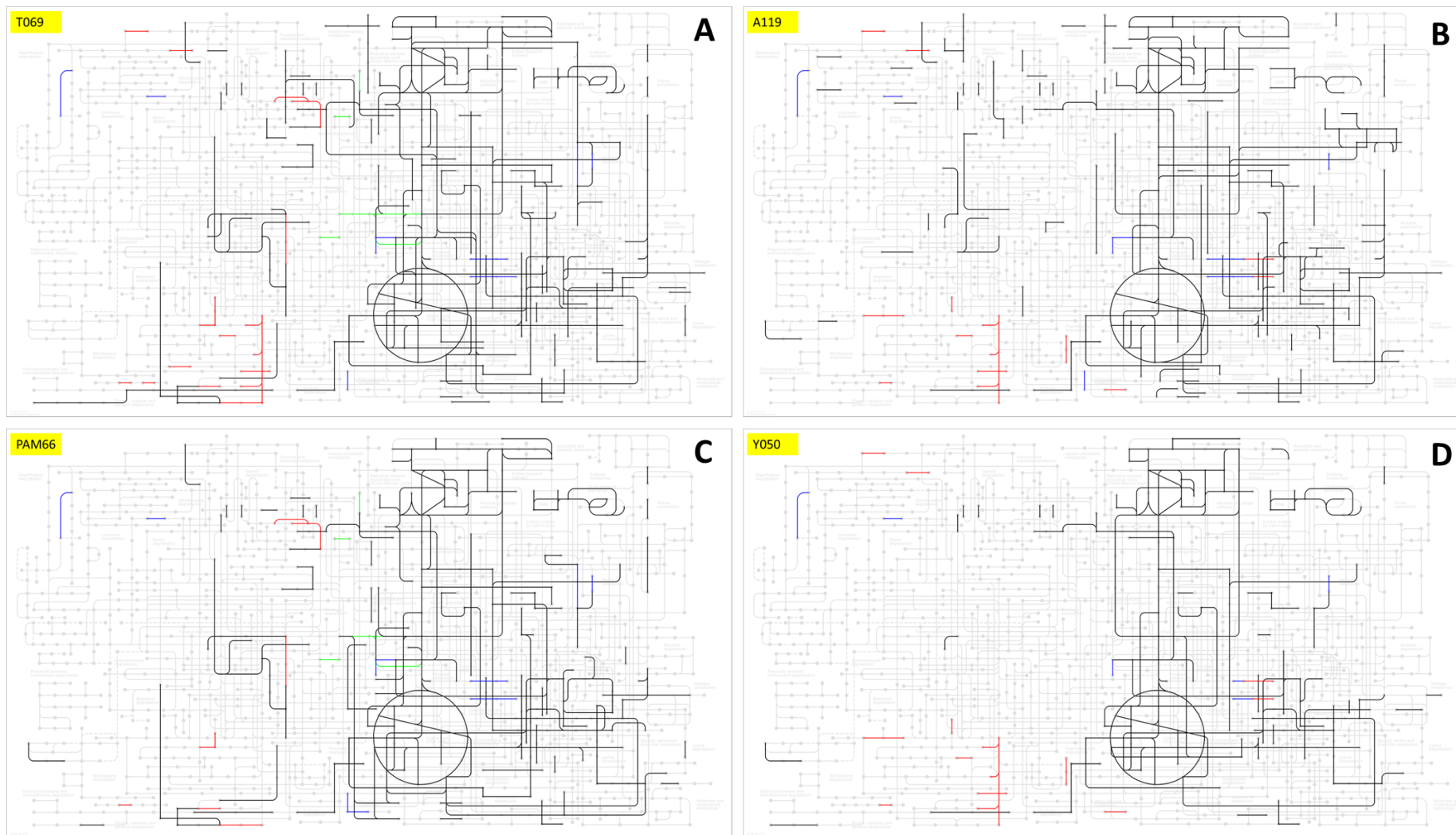


Hình 3.3. Bản đồ heatmap so sánh độ phong phú tương đối trong số lượng enzyme ở một số con đường trao đổi chất ở các đơn chủng phân giải Lindane trong nghiên cứu.

Ghi chú: Giá trị lớn nhất trong mỗi nhóm được tính là 100%, giá trị bé nhất được tính là 0%.

Đáng chú ý, *Pseudomonas putida* T069 có số lượng enzyme cao nhất trong các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene, với 4 enzyme được ghi nhận. Các chủng *Streptomyces katrae* A119 và *Streptomyces wuyuanensis* LD02, mặc dù không có số lượng enzyme lớn nhất, nhưng có sự đa dạng cao nhất về các con đường chuyển hóa so

với các chủng khác (Hình 3.3, Phụ lục 5). Hơn nữa, các chủng này có năng lực trao đổi chất đa dạng hơn đáng kể so với các chủng khác về chuyển hóa axit amin, chuyển hóa carbohydrate và sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp cũng như các quá trình dị hóa khác (Phụ lục 5). Những quan sát này cho thấy tiềm năng bổ sung của các chủng *Streptomyces* sp. cho các chủng vi khuẩn khác trong việc phân hủy Lindane. Đối với các chủng còn lại, ba chủng *Sphingobacterium* sp. (Y027, Y049 và Y052) và *Stenotrophomonas maltophilia* Y050 sở hữu số lượng enzyme ít nhất (Phụ lục 5). Tuy nhiên, *Sphingobacterium mizutaii* Y027 và *Stenotrophomonas maltophilia* Y050 vẫn sở hữu số lượng các con đường chuyển hóa gần bằng với *Pseudomonas putida* T069, chủng có bộ gen phong phú nhất. Đáng chú ý, *Stenotrophomonas maltophilia* Y050 là chủng vi khuẩn duy nhất mang enzyme haloalkane dehalogenase - một loại enzyme phân hủy các cơ chất tương tự như Lindane (Phụ lục 6).

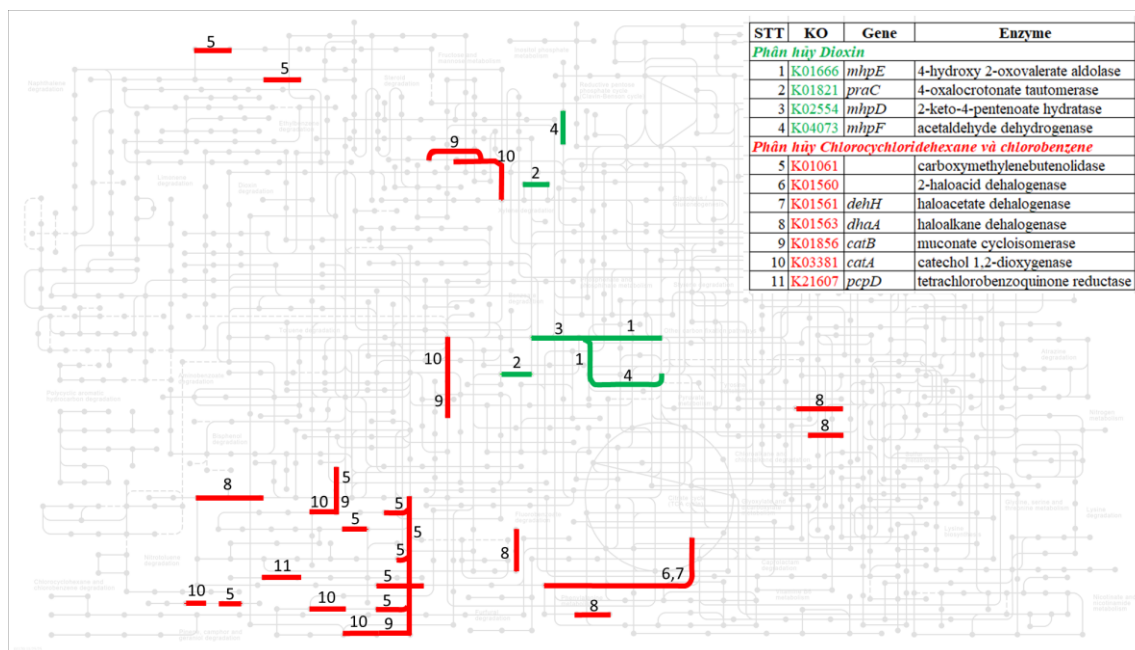


Hình 3.4. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của một số đơn chủng phân giải Lindane trong nghiên cứu.

Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

3.1.2 Chọn tạo tổ hợp chủng thông qua dự đoán tương tác dựa trên phân tích genome

Để dự đoán tương tác giữa các đơn chủng, bản đồ trao đổi chất của từng cặp hai đơn chủng được đối sánh với nhau để theo dõi sự hỗ trợ của các con đường. Hai nhóm con đường gồm “Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation” và “Dioxin degradation” được lựa chọn.



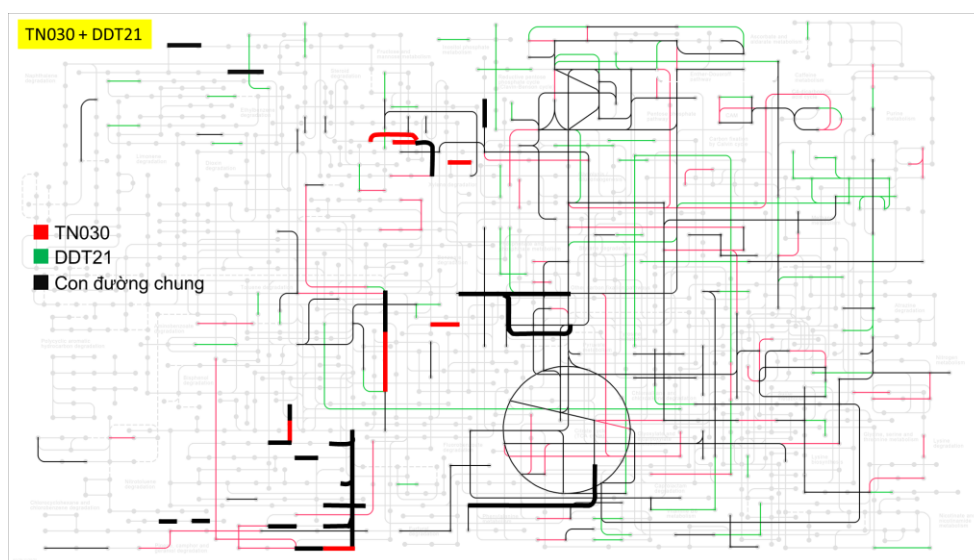
Hình 3.5. Chú thích những gen và enzyme tương ứng của những chủng nghiên cứu có tham gia vào hai con đường “Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation” và “Dioxin degradation” theo dữ liệu KEGG

3.1.2.1 Các tổ hợp chủng có khả năng phân giải DDT

Khi xét đến những chủng có khả năng phân giải DDT tốt nhất, chủng *Cupriavidus metallidurans* TN030 đáng được lưu ý vì có số lượng enzyme thuộc hai nhóm con đường “Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation” và “Dioxin degradation” cao nhất; hai nhóm con đường này liên quan đến việc phân giải các hợp chất có vòng chứa chloride, cấu trúc rất gần gũi với DDT (Hình 3.1). Việc sở hữu nhiều enzyme trong hai nhóm con đường này cho thấy *Cupriavidus metallidurans* TN030 có tiềm năng phân giải hiệu quả DDT, và nên được chọn lựa đưa vào các tổ hợp chủng. Bên cạnh đó, chủng *Streptomyces marianii* DDT21 có số lượng enzyme trong các con đường trao đổi chất là đa dạng nhất, thể hiện ở số lượng enzyme cao trong các nhóm con đường chung như “Metabolic

pathways”, “Biosynthesis of secondary metabolites”, “Microbial metabolism in diverse environments” và một số nhóm con đường phân giải các xenobiotics (Hình 3.1). Các kết quả phân tích tổng hợp (Hình 3.5 và Hình 3.6) cho thấy ngoài 1 số con đường chung thì chủng TN030 có thêm một số enzyme như muconate cycloisomerase (đường (9) màu đỏ Hình 3.5) và 4-oxalocrotonate tautomerase (đường (2) màu xanh Hình 3.5) là những enzyme tham gia vào con đường phân giải những hợp chất chứa chloride. Đồng thời, sự kết hợp hai chủng này mang lại sự đa dạng trao đổi chất hơn nhiều, do đó mà chúng được lựa chọn làm trung tâm cho các tổ hợp chủng.

Ngoài ra, các chủng *Pseudomonas* có tiềm năng hỗ trợ *Streptomyces marianii* DDT21 và *Cupriavidus metallidurans* TN030 trong các tổ hợp do tính linh hoạt chuyển hóa của các loài *Pseudomonas*. Trong 5 chủng thuộc chi *Pseudomonas* được tuyển chọn, dựa vào số lượng các enzyme chủ giải từ KEGG và kết quả về khả năng sinh enzyme oxy hóa, enzyme loại chloride và khả năng sinh biosurfactant (Phụ lục 7) thì chủng *Pseudomonas putida* T087 được nghi ngờ là một loài mới và bản đồ chuyển hóa của nó dường như là đơn giản nhất. Do đó, 4 chủng *Pseudomonas* còn lại (PAM64, PAM67, T006 và Y077) được lựa chọn để xây dựng tổ hợp chủng. Trong số hai chủng *Stenotrophomonas maltophilia* Y042 và *Stenotrophomonas maltophilia* Y050 thì chủng Y042 được lựa chọn vì có khả năng sinh enzyme oxy hóa vượt trội hơn và đa dạng hơn ở một số con đường trao đổi chất (Phụ lục 7).



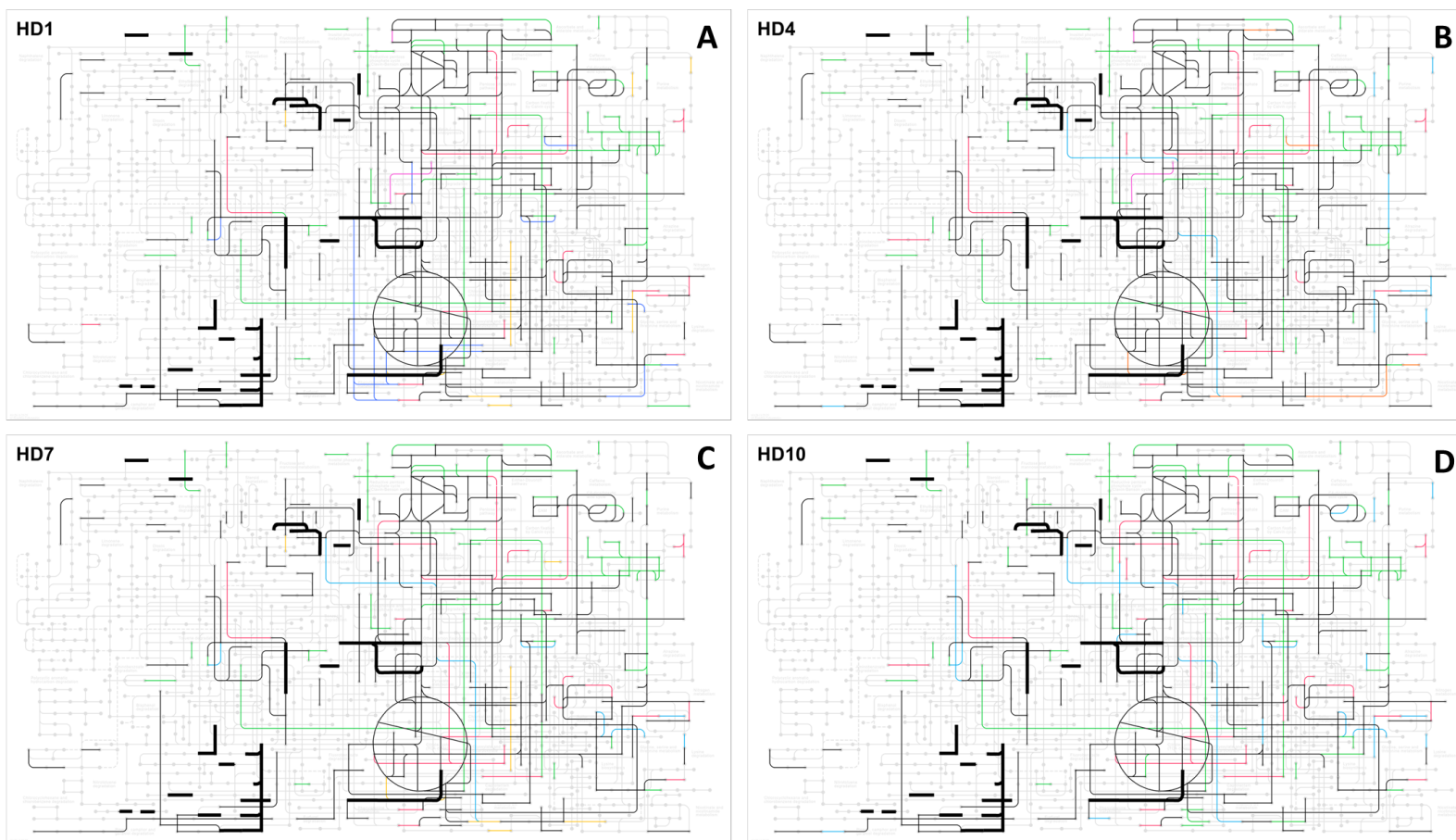
Hình 3.6. Bản đồ tổng hợp các con đường trao đổi chất của DDT21 và TN030.

Ghi chú: Con đường đặc trưng của mỗi chủng được đánh dấu bằng màu riêng. Những con đường bôi đậm là những con đường liên quan đến phân hủy Chlorocyclohexane, chlorobenzene và dioxin

Kế thừa kết quả nghiên cứu trước, hai chủng *Pseudomonas* sp. nov. T006 và *Pseudomonas nitroreducens* Y077 là hai chủng đơn lẻ có khả năng phân hủy DDT, sinh chất hoạt động bề mặt sinh học cũng như hoạt động của enzyme oxy hóa và enzyme loại chloride mạnh mẽ (Phụ lục 7, [9, 115]). Do đó, hai tổ hợp ba chủng đã được thiết kế bằng cách chỉ kết hợp một trong hai chủng đơn lẻ này với các chủng trung tâm *Streptomyces marianii* DDT21 và *Cupriavidus metallidurans* TN030.

Ngoài các tổ hợp ba chủng, điều cần thiết là phải nghiên cứu xem việc sử dụng nhiều chủng *Pseudomonas* hơn trong các tổ hợp có thể mang lại nhiều tiềm năng hơn cho các tổ hợp hay không. Xét hai chủng *Pseudomonas* sp. nov. T006 và *Pseudomonas nitroreducens* Y077 có thể thấy các con đường chuyển hóa của chúng thực sự rất giống nhau (xem các bản đồ chuyển hóa ở Phụ lục 15 và Phụ lục 16). Tương tự như vậy với hai chủng *Pseudomonas lalkuanensis* PAM64 và *Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67 (Phụ lục 13 – Hình 3.2C). Do vậy, để tối ưu khả năng hỗ trợ của các tổ hợp, PAM64 và PAM67 sẽ không có mặt trong cùng một tổ hợp; tương tự như vậy với T006 và Y077.

Chủng *Stenotrophomonas maltophilia* Y042 được dự đoán sẽ làm tăng tính đa dạng chuyển hóa nếu được bổ sung vào tổ hợp. Các loài *Stenotrophomonas* spp. cũng được biết là có khả năng phân hủy DDT tốt [84]. Trên thực tế, sự kết hợp của *Stenotrophomonas maltophilia* Y042 với tổ hợp bốn chủng (DDT21, TN030, T006 và PAM64) (Hình 3.7A) cung cấp sự bổ sung cho một số con đường chuyển hóa, chẳng hạn như các con đường phân hủy pinene và geraniol, một số con đường chuyển hóa axit amin và con đường chuyển hóa pyruvate. Sự kết hợp cũng mang lại sự hỗ trợ cho các con đường trao đổi chất trung tâm, chẳng hạn như một bước trong quá trình phân giải glucose/tạo glucose mới do glucose-1-phosphatase thực hiện và một bước trong quá trình chuyển hóa fructose và mannose do 2-dehydro-3-deoxy-L-rhamnonate dehydrogenase thực hiện. Sự đa dạng các con đường chuyển hóa trung tâm sẽ giúp cho việc phân giải các chất được diễn ra triệt để hơn và giúp các chất khoáng hóa nhanh hơn. Hơn nữa, sự đa dạng này cũng có nghĩa là tính linh hoạt trao đổi chất của các tổ hợp chủng sẽ cao hơn, qua đó sẽ tăng khả năng thích nghi và thể hiện hoạt tính của các tổ hợp khi được sử dụng ngoài thực địa.



Hình 3.7. Bản đồ chuyển hóa khi kết hợp các đơn chủng phân giải DDT thành các tổ hợp khác nhau

Ghi chú: A: (HD1 - DDT21, TN030, T006, PAM64, Y042); B: (HD4 - DDT21, TN030, Y077, PAM67, Y042); C: (HD7 - DDT21, TN030, Y077, PAM64); D: (HD10 - DDT21, TN030, Y077); Đỏ- TN030; Xanh lá – DDT21; Xanh da trời – Y077; Xanh nước biển – T006; Vàng – PAM64; Cam – PAM67; Hồng – Y042; Đen – Con đường chung. Những con đường bôi đậm là những con đường liên quan đến phân hủy Chlorocyclohexane, chlorobenzene và dioxin

Dựa trên các phân tích và dự đoán tương tác nêu trên, kết hợp với hoạt tính sinh enzyme oxy hóa, hoạt tính loại chloride, khả năng sinh biosurfactant và tính tính đối kháng của các đơn chủng (Phụ lục 7 và Phụ lục 8), 10 tổ hợp chủng phân giải DDT tiềm năng nhất được đề xuất thử nghiệm (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Công thức các tổ hợp phân giải DDT tiềm năng được đề xuất dựa trên tương tác giữa các đơn chủng

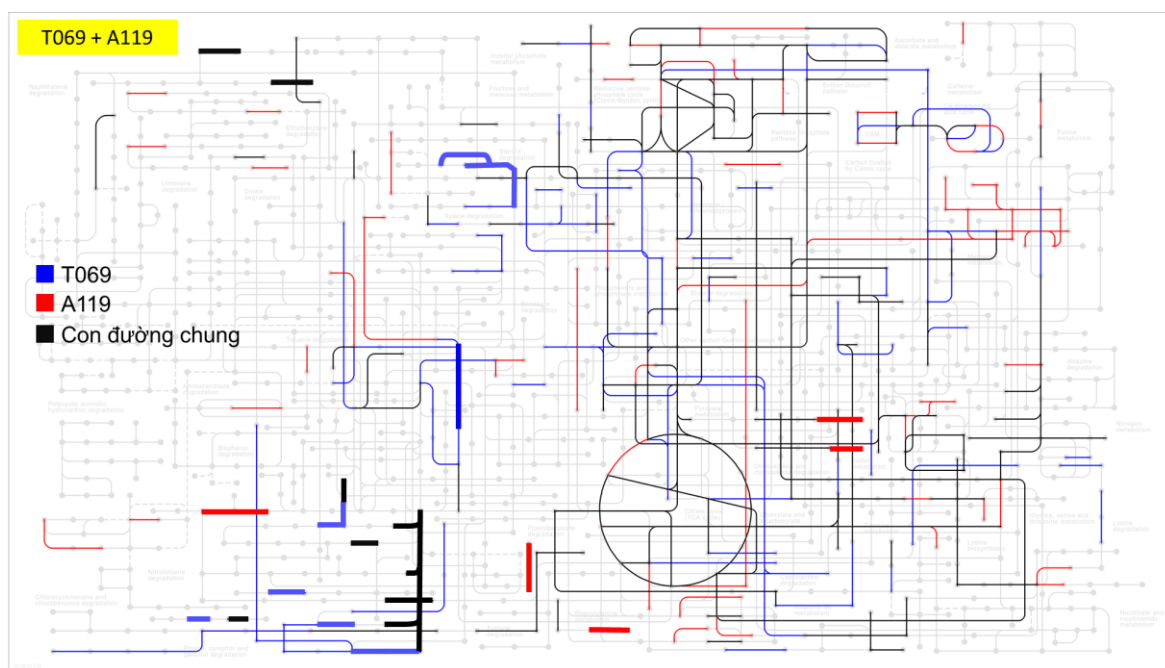
STT	Tên	Thành phần vi sinh vật
1	HD1	DDT21, TN030, T006, PAM64, Y042
2	HD2	DDT21, TN030, T006, PAM67, Y042
3	HD3	DDT21, TN030, Y077, PAM64, Y042
4	HD4	DDT21, TN030, Y077, PAM67, Y042
5	HD5	DDT21, TN030, T006, PAM64
6	HD6	DDT21, TN030, T006, PAM67
7	HD7	DDT21, TN030, Y077, PAM64
8	HD8	DDT21, TN030, Y077, PAM67
9	HD9	DDT21, TN030, T006
10	HD10	DDT21, TN030, Y077

3.1.2.2 Các tổ hợp chủng có khả năng phân giải Lindane

Khi xây dựng các công thức tổ hợp, yếu tố đầu tiên là tính đối kháng được xem xét. Dựa vào những nghiên cứu trước, chủng *Pseudomonas kribbensis* Y076 bị kháng bởi chủng *Sphingobacterium multivorum* Y049, *Sphingobacterium multivorum* Y052, *Streptomyces wuyuanensis* LD02; chủng *Sphingobacterium mizutaii* Y027, *Streptomyces katrae* A119 bị kháng bởi chủng *Pseudomonas kribbensis* Y076. Các chủng còn lại không được quan sát thấy có sự đối kháng lẫn nhau. Do đó, chúng tôi quyết định không sử dụng Y076 trong các tổ hợp chủng (Phụ lục 9) [2].

Ngoài ra, như đã trình bày trong mục 3.1.1, chủng *Pseudomonas putida* T069 được xác định là chủng có khả năng chuyển hóa phong phú nhất, bao gồm cả các con đường trao đổi chất phổ biến và các con đường liên quan đến phân hủy sinh học các hợp chất

xenobiotic. Đồng thời, chủng này cũng sở hữu số lượng enzyme liên quan cao nhất. Với đặc điểm nổi bật đó, *Pseudomonas putida* T069 được lựa chọn làm chủng trung tâm trong quá trình xây dựng các tổ hợp vi sinh. Bên cạnh đó, chủng xạ khuẩn *Streptomyces katrae* A119 thể hiện các con đường trao đổi chất đa dạng và có nhiều con đường khác biệt so với các chủng vi khuẩn còn lại, bao gồm cả *Pseudomonas putida* T069. Do có tiềm năng bổ trợ lẫn nhau về mặt trao đổi chất, hai chủng T069 và A119 được lựa chọn làm thành phần cốt lõi trong các tổ hợp khi xây dựng. Có thể thấy, khi kết hợp các bản đồ chuyển hóa của hai chủng A119 và T069, các chủng này bổ sung cho nhau trong một số con đường chuyển hóa các hợp chất chứa chloride như chủng *Pseudomonas putida* T069 có một số enzyme như carboxymethylenebutenolidase, muconate cycloisomerase, catechol 1,2-dioxygenase và tetrachlorobenzoquinone reductase; trong khi đó chủng *Streptomyces katrae* A119 có enzyme như haloalkane dehalogenase (Hình 3.8). Ngoài ra, hai chủng cũng bổ trợ cho nhau trong nhiều con đường chẳng hạn như các con đường chuyển hóa cacbon, như con đường pentose phosphate hoặc các con đường chuyển hóa xenobiotic, như con đường phân hủy benzoate (Hình 3.8). Ví dụ, trong con đường phân hủy benzoate, chủng A119 sở hữu enzyme 2-aminobenzoate-CoA ligase để sản xuất anthranilate, có thể được enzyme catechol 1,2-dioxygenase của T069 sử dụng.



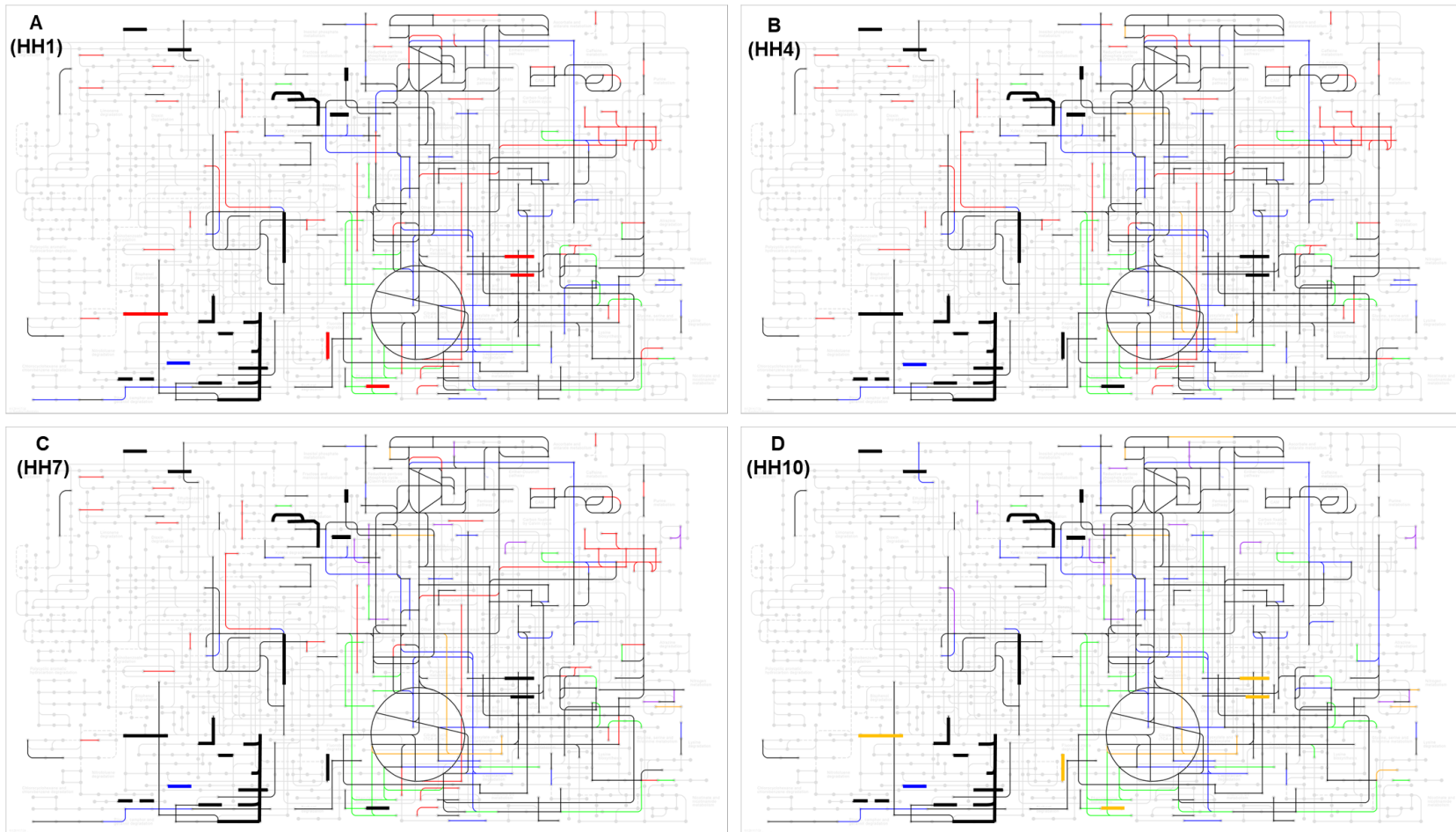
Hình 3.8. Bản đồ tổng hợp các con đường trao đổi chất của A119 và T069.

Ghi chú: Con đường đặc trưng của mỗi chủng được đánh dấu bằng màu riêng. Những con đường bôi đậm là những con đường liên quan đến phân hủy Chlorocyclohexane và chlorobenzene

Để tăng thêm tính đa dạng về mặt trao đổi chất của các tổ hợp cần xây dựng, các chủng tiềm năng khác đã được chọn để kết hợp với hai chủng trung tâm. Trong số hai chủng *Pseudomonas putida* PAM65 và *Pseudomonas putida* PAM66 thì chủng *Pseudomonas putida* PAM66 có một số enzyme độc đáo như con đường phân hủy 2-hydroxy-6-oxonona-2,4-dienedioate hydrolase trong các hợp chất thơm hoặc các enzyme khác liên quan đến các con đường trao đổi chất, bao gồm chuyển hóa lưu huỳnh, chuyển hóa metan, phân hủy furfural hoặc các con đường phân hủy pinene và geraniol. Do đó, *Pseudomonas putida* PAM66 được lựa chọn để đưa vào xây dựng tổ hợp do tính ưu việt của nó trong sự đa dạng về các con đường trao đổi chất.

Ngoài ra, xét 3 chủng *Sphingobacterium* thì chủng *Sphingobacterium mizutaii* Y027 được lựa chọn do có số lượng con đường chuyển hóa cao và khả năng sinh hai loại enzyme oxy hóa và loại chloride đều ở mức tốt (Phụ lục 7). Chi *Stenotrophomonas* với đại diện là chủng *Stenotrophomonas maltophilia* Y050 cũng được lựa chọn do chứa một số enzyme độc đáo có thể làm tăng độ đa dạng trao đổi chất của tổ hợp đa chủng.

Sau quá trình chọn lọc nêu trên, năm chủng vi sinh vật được chọn (T069, A119, PAM66, Y027 và Y050) đã được kết hợp để tạo thành 10 tổ hợp vi sinh vật (Bảng 3.6). Hai chủng trung tâm T069 và A119, đã được kết hợp với từng chủng hỗ trợ (PAM66, Y050 và Y027) để thăm dò khả năng bổ sung của các chủng này. Ngoài ra, tổ hợp bốn chủng và năm chủng chứa hai chủng trung tâm và hai chủng hỗ trợ để kiểm tra tính bổ sung của mỗi chủng hỗ trợ với các chủng hỗ trợ khác và với các chủng trung tâm. Ví dụ, bổ sung *Stenotrophomonas maltophilia* Y050 trong tổ hợp bốn chủng chứa *Pseudomonas putida* T069, *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* PAM66 có thể hoàn thành một số con đường liên quan đến chuyển hóa trung tâm và chuyển hóa tyrosine (Hình 3.9B). Ngoài ra, ba tổ hợp chỉ chứa các chủng vi khuẩn cũng đã được xây dựng để nghiên cứu các tương tác chuyển hóa khi chủng xạ khuẩn A119 không có mặt (Hình 3.9A). Trong mỗi tổ hợp này, PAM66 được thêm vào để tăng tính đa dạng vì đây là một trong những chủng có nhiều chuyển hóa nhất, do đó có khả năng cải thiện tính linh hoạt về chuyển hóa của các tổ hợp này.



Hình 3.9. Bản đồ chuyển hóa khi kết hợp các đơn chủng phân giải Lindane thành các tổ hợp khác nhau

Ghi chú: A: (HH1:A119, T069, PAM66); B: (HH4:A119, T069, PAM66, Y050); C: (HH7:A119, PAM66, T069, Y050, Y027); D: (HH10:T069, PAM66, Y050, Y027). Với mỗi màu sắc đại diện A119 – đỏ ; T069 – Xanh dương ; PAM66 – Xanh lá ; Y050 – Vàng ; Y027 : Tím và Đen - con đường chung. Những con đường bôi đậm là những con đường liên quan đến phân hủy Chlorocyclohexane và chlorobenzene

Dựa trên các phân tích và dự đoán tương tác nêu trên, kết hợp với hoạt tính sinh enzyme oxy hóa, hoạt tính loại chloride, khả năng sinh biosurfactant và tính tính đối kháng của các đơn chủng (Phụ lục 7 và Phụ lục 9) 10 tổ hợp chủng phân giải Lindane tiềm năng nhất được đề xuất thử nghiệm (Bảng 3.6).

Bảng 3.6. Công thức các tổ hợp phân giải Lindane tiềm năng được đề xuất dựa trên tương tác giữa các đơn chủng

STT	Tên	Thành phần vi sinh vật
1	HH1	T069, A119, PAM66
2	HH2	T069, A119, Y050
3	HH3	T069, A119, Y027
4	HH4	T069, A119, PAM66, Y050
5	HH5	T069, A119, PAM66, Y027
6	HH6	T069, A119, Y050, Y027
7	HH7	T069, A119, PAM66, Y050, Y027
8	HH8	T069, PAM66, Y050
9	HH9	T069, PAM66, Y027
10	HH10	T069, PAM66, Y050, Y027

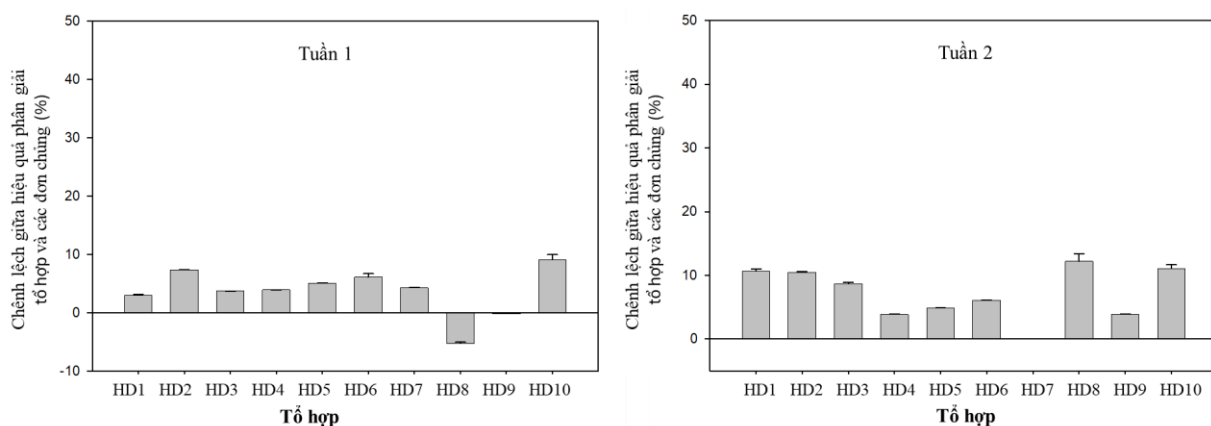
3.1.3 Nghiên cứu đánh giá hiệu quả phân giải DDT và Lindane của các tổ hợp chủng và đánh giá các đặc tính liên quan đến khả năng ứng dụng thực tế

3.1.3.1 Khảo sát khả năng phân giải DDT của các tổ hợp chủng đề xuất trong các môi trường khác nhau

Hiệu quả phân giải trong môi trường lỏng

Trong môi trường lỏng, hiệu quả loại bỏ DDT của tổ hợp cao hơn một chút so với các chủng riêng lẻ, nhìn chung khoảng 10% (Hình 3.10). Các tổ hợp có khả năng phân hủy DDT tốt hơn trong môi trường lỏng sau một tuần là HD2, HD4, HD5, HD6 và HD10 (Hình 3.10A), và các tổ hợp sau 2 tuần là HD1, HD2, HD3, HD8 và HD10 (Hình 3.10B). Kết quả cho thấy các chủng trong tổ hợp có thể đã có tương tác bổ sung trong quá trình phân hủy DDT như dự đoán từ kết quả khai thác bộ gen, nhưng chúng

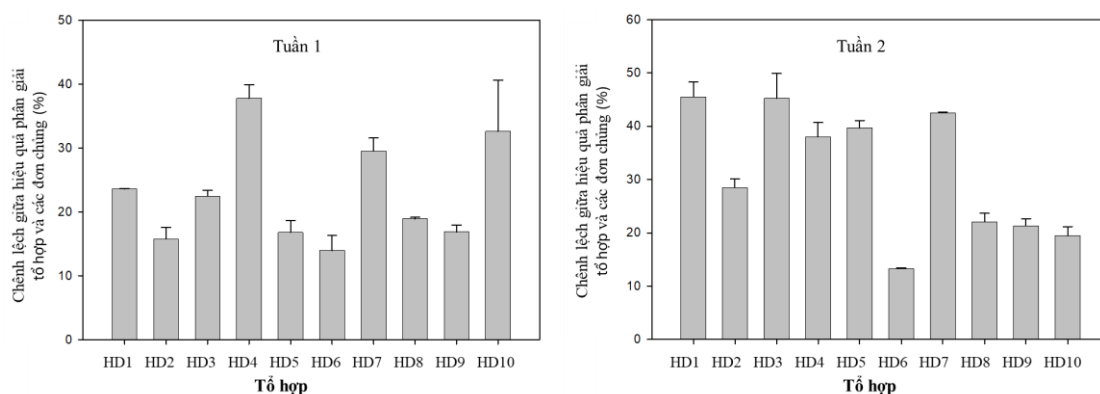
không phát huy những tương tác đó một cách mạnh mẽ trong môi trường lỏng, có thể là do chúng không tiếp xúc gần với môi trường như vậy. Trong môi trường lỏng, ngay cả khi ủ lắc, DDT vẫn có thể tách khỏi pha nước, do đó vi sinh vật khó tiếp cận và các tương tác bổ sung của chúng cũng có thể không giúp ích nhiều.



Hình 3.10. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải DDT giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường lỏng

Hiệu quả phân giải trong môi trường bán rắn

Trong môi trường bán rắn, hiệu quả loại bỏ DDT của các tổ hợp cao hơn đáng kể so với các chủng đơn lẻ, lên đến khoảng 40% (Hình 3.11). Các tổ hợp cũng phân hủy DDT tốt trong môi trường bán rắn sau 2 tuần. So với trong môi trường lỏng, hiệu quả phân hủy DDT của các tổ hợp chủng trong môi trường bán rắn là đáng kể và có sự khác biệt rõ rệt giữa các tổ hợp khác nhau. Các tổ hợp nổi bật về hiệu quả phân hủy DDT trong môi trường bán rắn bao gồm HD1, HD3, HD4 và HD7.

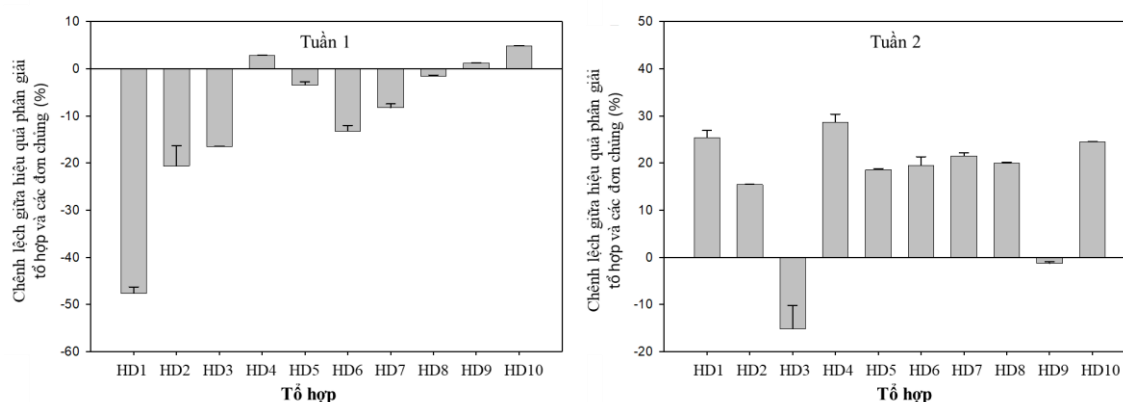


Hình 3.11. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải DDT giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường bán rắn

Hiệu quả phân giải trong môi trường rắn

Đối với môi trường rắn, khả năng phân hủy DDT của tổ hợp không tốt bằng các chủng đơn lẻ sau 1 tuần (Hình 3.12) nhưng trở nên cao hơn nhiều so với sau 2 tuần, hơn 20% (Hình 3.12). Nhìn chung, sau 2 tuần, các tổ hợp cho thấy hiệu quả loại bỏ tốt hơn (so với các chủng đơn lẻ) là HD1, HD4, HD7 và HD10.

Trong môi trường rắn, vi khuẩn thường cần nhiều thời gian hơn để thiết lập sự tương tác, do phải lan rộng và sản xuất các hóa chất ngoại bào nhằm tạo điều kiện cho các quá trình trao đổi. Vì mật độ tế bào ban đầu trong cả các nuôi cấy đơn và tổ hợp được bố trí gần như tương đương, nên mật độ của từng chủng trong tổ hợp thấp hơn so với khi nuôi cấy riêng lẻ. Hiệu suất phân giải DDT của các chủng vi khuẩn cũng không đồng nhất. Do đó, trong tuần đầu tiên, khi sự tương tác giữa các chủng trong hệ tổ hợp vẫn còn hạn chế, các nuôi cấy đơn lẻ thể hiện khả năng phân hủy DDT tốt hơn nhờ mật độ tế bào cao của từng chủng. Ngược lại, đến tuần thứ hai, khi sự phát triển và phối hợp giữa các chủng trong tổ hợp trở nên rõ rệt, hiệu quả phân hủy DDT được cải thiện và vượt trội hơn so với các chủng riêng lẻ. Dù chưa có công trình nào được công bố về phân hủy sinh học trong hệ tổ hợp để đối chiếu trực tiếp, một số nghiên cứu đã cho thấy rằng trong môi trường rắn, quá trình phân hủy thường khởi đầu chậm nhưng lại có xu hướng hoàn tất nhanh hơn ở giai đoạn sau so với môi trường lỏng [40] [74].



Hình 3.12. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải DDT giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường rắn

Tổng hợp các kết quả có thể thấy, nhìn chung, các tổ hợp chủng thể hiện khả năng phân hủy DDT cao hơn so với các chủng đơn lẻ. Sự khác biệt này đặc biệt rõ

trong môi trường rắn, và nổi bật nhất ở điều kiện bán rắn. Một nguyên nhân có thể xuất phát từ đặc tính kỵ nước của DDT, khiến hợp chất này dễ bị hấp phụ lên bề mặt chất rắn – trong trường hợp nghiên cứu này là agarose. Khi đã bám lên bề mặt, DDT trở nên sẵn sàng hơn cho vi sinh vật tiếp cận và phân giải nhờ các enzyme ngoại bào, đồng thời quá trình này có thể được tăng cường thông qua trao đổi chất giữa các chủng. Tuy nhiên, trong môi trường rắn, vi sinh vật thường cần nhiều thời gian hơn để phát triển, lan tỏa và tiết enzyme so với trong môi trường bán rắn. Điều này có thể giải thích vì sao tổ hợp vi sinh đạt hiệu quả phân giải DDT cao nhất trong điều kiện bán rắn. Kết quả này cũng mang ý nghĩa thực tiễn, bởi môi trường bán rắn có đặc điểm tương đồng hơn cả với điều kiện đất tự nhiên.

3.1.3.2 Khảo sát khả năng phân giải DDT của các tổ hợp chủng đề xuất trong các điều kiện thực tế khác nhau

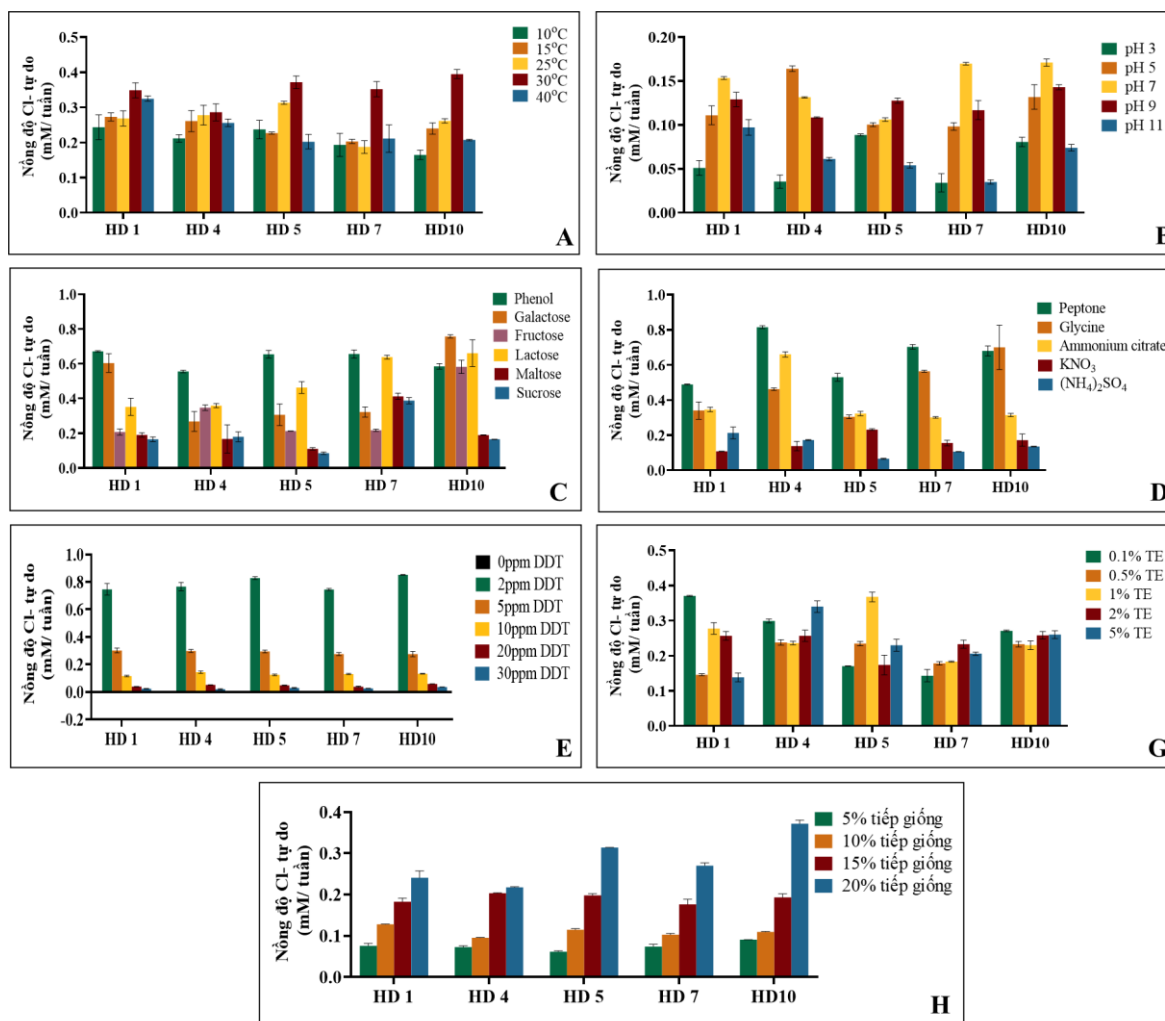
Từ các kết quả trình bày ở trên, 5 tổ hợp có khả năng phân giải DDT tốt nhất là HD1, HD4, HD5, HD7 và HD10 được lựa chọn để nghiên cứu tiếp. Cụ thể, các điều kiện thực tế ảnh hưởng đến khả năng phân giải DDT của các tổ hợp này được khảo sát.

Xét về ảnh hưởng của nhiệt độ, các tổ hợp có khả năng phân hủy DDT ở phổ nhiệt độ rộng từ 10 - 40°C (Hình 3.13A). Khoảng nhiệt độ cho hoạt tính loại chloride cao nhất là từ 25 - 30°C. Kết quả này cho thấy, có lẽ khả năng tương tác của các chủng với nhau đã giúp tăng cường tính linh hoạt của các chủng, qua đó cho phép các tổ hợp thích nghi tốt hơn với nhiệt độ thay đổi. Các tổ hợp này sẽ có những lợi thế thực tế khi được sử dụng ở những khu vực có điều kiện khí hậu khắc nghiệt, nơi nhiệt độ dưới 10°C vào mùa đông hoặc trên 40°C vào mùa hè như miền Trung của Việt Nam.

Về ảnh hưởng của pH, kết quả (Hình 3.13B) cho thấy các tổ hợp được nghiên cứu có khả năng loại chloride tốt ở pH 5-9, và pH tối ưu chủ yếu là 7. Tuy nhiên, có một số trường hợp ngoại lệ, chẳng hạn như HD5 loại chloride nhiều nhất ở pH9 hoặc HD4 hoạt động tốt nhất ở pH5. Các kết quả này là khó lý giải, cũng có thể là do tương tác giữa các chủng trong các tổ hợp đó, cho phép thích ứng tốt hơn với các pH. Đáng chú ý, HD10 có hoạt tính loại chloride tốt trong phổ pH rộng từ 3-11. Điều thú vị là

tổ hợp này chỉ bao gồm ba chủng (*Streptomyces marianii* DDT21, *Cupriavidus metallidurans* TN030 và *Pseudomonas nitroreducens* Y077). Có lẽ sự kết hợp của chỉ 3 chủng này là đủ để đảm bảo khả năng thích nghi tốt với sự thay đổi pH. Các chi *Streptomyces*, *Ralstonia* và *Pseudomonas* được biết là có khả năng sinh trưởng và hoạt động trong phạm vi pH rộng [63].

Một yếu tố khác ảnh hưởng đến hiệu suất phân giải DDT của tổ hợp là các chất dinh dưỡng, bao gồm nguồn cacbon và nguồn nitơ. Khi khảo sát việc bổ sung các nguồn cacbon bổ sung khác nhau, các tổ hợp hoạt động khác nhau. Kết quả thu được cho thấy, các tổ hợp có xu hướng loại bỏ chloride tốt hơn khi được bổ sung phenol hoặc đường đơn, chẳng hạn như galactose và fructose, so với khi được bổ sung các loại đường phức tạp khác. Khi sử dụng phenol làm nguồn cacbon bổ sung, hoạt động mạnh của các tổ hợp cho thấy chúng có khả năng phân hủy các hợp chất thơm tốt. Điều này có thể liên quan đến tiềm năng phân hủy DDT tốt của các chủng riêng lẻ. Về khả năng phát triển với các nguồn cacbon khác nhau, chúng ta có thể thấy rằng các tổ hợp HD7 và HD10 thể hiện hoạt động loại chloride tích cực và linh hoạt nhất với các nguồn cacbon bổ sung đa dạng (Hình 3.13C). Tất cả các tổ hợp này đều chứa ba chủng DDT21, TN030 và Y077, và có lẽ sự tương tác giữa các chủng này là lý do khiến các tổ hợp thích nghi tốt hơn với các nguồn cacbon khác nhau. Đáng chú ý, ba tổ hợp này (HD7, HD8 và HD10) cũng cho thấy khả năng linh hoạt hơn so với các tổ hợp khác khi tiếp nhận các nguồn nitơ khác nhau (Hình 3.13D), mặc dù dường như tất cả các tổ hợp còn lại đều có thể sử dụng các nguồn nitơ bổ sung (peptone, glycine – một axit amin dễ sử dụng, ammonium citrate, nitrate và ammonium sulfate – những nguồn nitơ mà vi sinh vật thường dễ sử dụng). Ngoài ra, các tổ hợp HD2, HD6 và HD9 cũng thể hiện hoạt tính phân giải DDT tốt với các nguồn nitơ khác nhau (Hình 3.13D).



Hình 3.13. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến hoạt động loại chloride của các chủng vi sinh vật phân hủy DDT được xây dựng

Ghi chú: A: nhiệt độ; B: pH; C: nguồn cacbon; D: nguồn nitơ; E: nồng độ chất ô nhiễm; G: tỷ lệ nguyên tố vi lượng; H: tỷ lệ tiếp giống

Ảnh hưởng của nồng độ DDT đến hoạt tính loại chloride của các tổ hợp cũng được khảo sát vì đây là một yếu tố quan trọng quyết định tiềm năng ứng dụng của chúng trong thực tế [84]. Kết quả (Hình 3.13E) cho thấy, nhìn chung, tốc độ loại bỏ chloride của các tổ hợp giảm khi nồng độ DDT ban đầu tăng. Điều này là có thể lý giải được vì khi nồng độ DDT tăng, cường độ trao đổi chất của vi sinh vật cũng tăng lên do DDT có thể đóng vai trò là nguồn cacbon và năng lượng; tuy nhiên nồng độ DDT quá cao có thể gây ức chế hoạt động của vi sinh vật [84]. Trong số các tổ hợp

được thử nghiệm, HD10 thể hiện khả năng loại chloride tốt ở các nồng độ DDT khác nhau, nghĩa là nó vẫn loại bỏ chloride ở mức đáng kể ngay cả khi nồng độ DDT cao (ở mức 20-30 ppm). Đáng chú ý là tổ hợp này cũng thích nghi tốt nhất với các mức pH khác nhau, như đã thảo luận ở trên. Thực tế, quá trình loại chloride thường đi kèm với sự giải phóng H^+ , dẫn đến giảm pH môi trường [30]. Vì vậy, các tổ hợp chủng nào có khả năng thích nghi tốt hơn với sự thay đổi pH thường cũng có khả năng thích nghi tốt hơn với các nồng độ DDT khác nhau.

Tỷ lệ các nguyên tố vi lượng bổ sung vào môi trường nuôi cấy cũng là yếu tố quan trọng cho sự phát triển và hoạt tính của vi sinh vật [69]. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của yếu tố này (Hình 3.13G) cho thấy các tổ hợp HD4, HD7 và HD10 duy trì hoạt tính loại chloride ổn định với các mức khoáng vi lượng khác nhau. Hơn nữa, việc bổ sung khoảng 0,1 - 0,5% nguyên tố vi lượng vào môi trường nuôi cấy nhìn chung phù hợp với tất cả các tổ hợp, trong khi việc bổ sung quá nhiều có thể ức chế một số tổ hợp.

Chế phẩm vi sinh được coi là có hiệu quả ứng dụng thực tế cao hơn khi được sử dụng với tỷ lệ tiếp giống thấp. Do đó, hiệu quả phân giải DDT của các tổ hợp chủng được khảo sát ở các tỷ lệ tiếp giống khác nhau. Kết quả (Hình 3.13H) cho thấy, nhìn chung, khi tăng tỷ lệ tiếp giống từ 5% đến 20%, khả năng loại chloride của mỗi tổ hợp đều tăng dần.

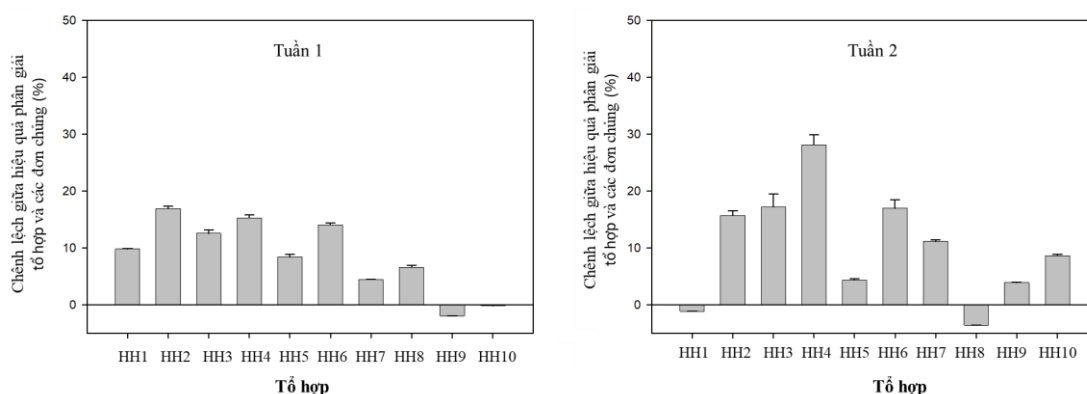
Tổng hợp tất cả các kết quả nêu trên, có thể thấy HD4 và HD7 là những tổ hợp vừa có khả năng phân hủy DDT hiệu quả vừa thích ứng với các điều kiện thực tế đa dạng. Những ưu thế này có thể là do sự tương tác giữa các chủng vi khuẩn trong các tổ hợp đó. Đáng chú ý, trong cả 2 tổ hợp đó, ngoài hai chủng trung tâm *Streptomyces marianii* DDT21 và *Cupriavidus metallidurans* TN030, còn có sự xuất hiện của chủng *Pseudomonas nitroreducens* Y077. Cần lưu ý rằng *Pseudomonas* là một chi bao gồm các vi khuẩn có thể hoạt động mạnh mẽ và linh hoạt trong các điều kiện môi trường khác nhau [104]. Khi phân tích kỹ bản đồ KEGG (Hình 3.8) về trao đổi chất của các tổ hợp, chúng ta có thể thấy rằng việc thêm *Pseudomonas nitroreducens* Y077

vào tổ hợp có sự xuất hiện của một số enzyme như D-lactate dehydratase (K05523). Enzym này xúc tác phản ứng chuyển đổi 2-oxopropanal thành lactate. Chất 2-oxopropanal hay methylglyoxal là dạng khử của axit pyruvic và là sản phẩm phụ của quá trình đường phân và một số con đường chuyển hóa cacbon trung tâm khác [58]. Methylglyoxal là một hợp chất có độc tính cao và có thể được vi khuẩn tiết ra bên ngoài [35, 131]. Hai chủng *Streptomyces marianii* DDT21 và *Cupriavidus metallidurans* TN030 không có enzyme này. Do đó, việc bổ sung enzym này bằng *Pseudomonas nitroreducens* Y077 có thể giúp hỗ trợ sự phát triển và hiệu suất của vi khuẩn đối tác. Ngoài ra, *Pseudomonas nitroreducens* Y077 cũng cung cấp một số con đường bổ sung liên quan đến quá trình chuyển hóa của một số axit amin khác nhau như glycine, serine, threonine và lysine. Không chắc chắn rằng các đặc điểm nêu trên của *Pseudomonas nitroreducens* Y077 là lý do cho những ưu điểm của HD4 và HD7 nhưng đây cũng có thể là một khả năng.

3.1.3.3 Khảo sát khả năng phân giải Lindane của các tổ hợp chủng đề xuất trong các dạng môi trường khác nhau

Hiệu quả phân giải trong môi trường lỏng

Trong môi trường lỏng, các tổ hợp cho thấy hiệu quả loại bỏ Lindane cao hơn so với các chủng riêng lẻ sau 2 tuần, khoảng 20% (Hình 3.14). Sau 2 tuần, HH2, HH3, HH4 và HH6 có hiệu quả loại bỏ Lindane tốt nhất, với chênh lệch hiệu quả loại bỏ của HH4 (so với các chủng riêng lẻ) lên tới 30%. Có thể thấy, HH7 (tổ hợp có thành phần phức tạp), sẽ cần nhiều thời gian hơn để thích nghi so với các chủng đơn lẻ. Mặt khác, hiệu quả loại bỏ Lindane của ba tổ hợp không chứa xạ khuẩn, bao gồm HH8, HH9 và HH10 cho hiệu quả thấp (chỉ cao hơn khoảng 15% so với hiệu quả của các chủng đơn lẻ), tức là thấp hơn nhiều so với hiệu quả của các tổ hợp khác có chứa *S. katrae* A119. Do đó, có thể đưa ra giả thuyết rằng sự góp mặt của *S. katrae* A119 đóng vai trò quan trọng trong việc tăng khả năng tiếp cận Lindane và cũng góp phần cải thiện khả năng chuyển hóa chung của các tổ hợp trong môi trường lỏng.



Hình 3.14. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải Lindane giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường lỏng

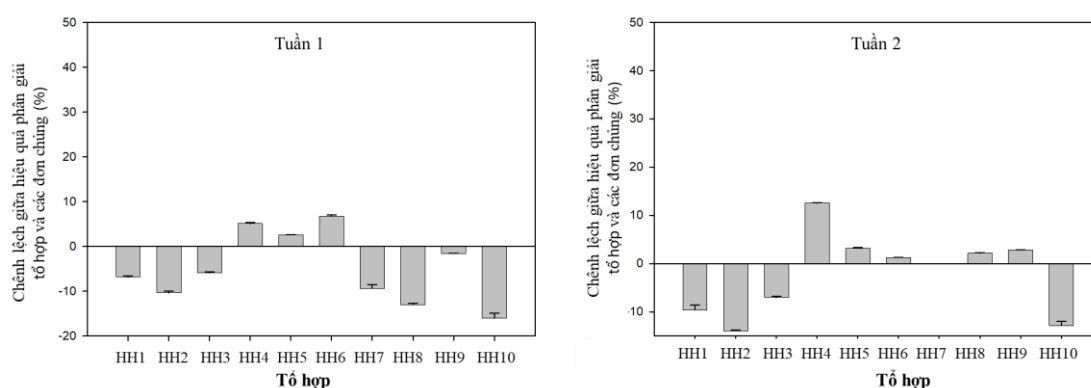
Hiệu quả phân giải trong môi trường bán rắn

Trong môi trường bán rắn, hiệu quả loại bỏ Lindane của tổ hợp giảm đáng kể hoặc không khác nhiều so với các chủng đơn lẻ (Hình 3.15). Chỉ có ba tổ hợp (HH4, HH5 và HH6) hoạt động tốt hơn một chút so với các chủng đơn lẻ. Những kết quả này cho thấy có cả tương tác tích cực và tiêu cực trong tổ hợp, và tương tác tiêu cực có thể xảy ra chủ yếu hơn trong điều kiện môi trường bán rắn.

Có thể giả định rằng độ rắn của môi trường ảnh hưởng đến mức độ tương tác giữa các vi sinh vật. Trong môi trường lỏng, vi sinh vật dễ dàng di chuyển đến vị trí có chất cần xử lý, trong khi ở môi trường rắn hoặc bán rắn, khả năng di chuyển này bị hạn chế. Các chủng phân hủy Lindane có thể khó tiếp cận cơ chất trong môi trường bán rắn, đặc biệt khi không có tính hướng động hóa học đối với Lindane. Điều này có thể dẫn đến sự cạnh tranh gay gắt về nguồn năng lượng và cacbon duy nhất là Lindane, khi các chủng được nuôi phối hợp. Sự cạnh tranh này có khả năng làm giảm tương tác cộng hưởng và gia tăng cạnh tranh đối kháng. Đáng lưu ý là trường hợp tổ hợp HH7, với hiệu suất loại bỏ Lindane thuộc nhóm thấp nhất so với các tổ hợp và các chủng đơn lẻ khác, mặc dù chứa đủ cả năm chủng (Hình 3.15). Ngược lại, hai tổ hợp gồm bốn chủng là HH4 và HH6 có hiệu suất phân hủy cao hơn so với các chủng đơn lẻ. Điểm khác biệt quan trọng giữa HH4/HH6 và HH7 là sự vắng mặt đồng thời của PAM66 và Y027 trong hai tổ hợp hiệu quả này. Các tổ hợp khác chứa cả hai

chúng trên, chẳng hạn HH9 và HH10, cũng cho hiệu quả thấp, cho thấy khả năng tồn tại tương tác tiêu cực giữa PAM66 và Y027 trong môi trường bán rắn.

Tương tự kết quả ở môi trường lỏng, các tổ hợp không chứa xạ khuẩn (HH8, HH9 và HH10) không thể hiện sự khác biệt đáng kể về hiệu quả phân hủy so với các tổ hợp khác và với các chủng đơn lẻ. Điều này tiếp tục củng cố giả thuyết rằng xạ khuẩn *Streptomyces katrae* A119 đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy Lindane.



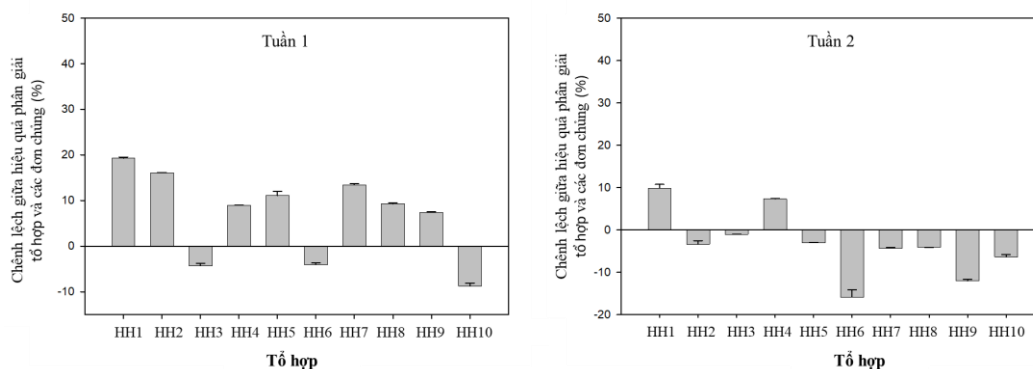
Hình 3.15. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải Lindane giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường bán rắn

Hiệu quả phân giải trong môi trường rắn

Về các thí nghiệm trên môi trường rắn, kết quả rất không nhất quán với các thí nghiệm trên môi trường bán rắn: hiệu suất loại bỏ Lindane của tổ hợp thấp hơn đáng kể so với trong môi trường lỏng, cho thấy rằng có thể có sự tương tác tiêu cực giữa các chủng thành phần. Mặc dù một số tổ hợp cho thấy hiệu suất tốt (có thể là do tương tác tích cực) sau 1 tuần (HH1, HH2, HH4, HH5, HH7, HH8 và HH9), nhưng sự khác biệt về hiệu suất loại bỏ cao nhất so với các chủng đơn lẻ chỉ đạt gần 20% (theo HH1) (Hình 3.16). Hơn nữa, hầu hết các tổ hợp cuối cùng đều cho thấy hiệu suất loại bỏ Lindane thấp hơn so với các chủng đơn lẻ sau 2 tuần, ngoại trừ HH1 và HH4 (Hình 3.16). Những kết quả này một lần nữa xác nhận rằng các tương tác tiêu cực trong tổ hợp được thể hiện rõ rệt trong môi trường rắn, có thể là do khả năng tiếp cận các cơ

chất hạn chế, dẫn đến sự cạnh tranh gia tăng giữa các chủng thành phần và do đó làm giảm hiệu suất phân hủy Lindane của từng tổ hợp.

Tuy nhiên, trong môi trường rắn, hai tổ hợp HH1 và HH4 vẫn duy trì hiệu quả loại bỏ Lindane cao hơn so với các chủng đơn lẻ. Điều này cho thấy sự tương tác tích cực vững chắc giữa các chủng của chúng. Tổ hợp 3 chủng HH1 chứa *Pseudomonas putida* PAM66, được cho là có tiềm năng đáng kể để bổ sung cho các chủng cốt lõi, *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* T069. Tổ hợp HH4 - tổ hợp 4 chủng - thì chứa *Pseudomonas putida* PAM66 và cả *Stenotrophomonas maltophilia* Y050. Do đó, *Pseudomonas putida* PAM66 có thể có vai trò bổ sung quan trọng trong các tổ hợp này, nhiều khả năng là do các enzyme ngoại bào của nó giúp cải thiện quá trình chuyển hóa và tăng cường khả năng tiếp cận Lindane. Thật vậy, *Pseudomonas putida* đã được báo cáo là một trong những loài vi khuẩn tốt nhất sản xuất nhiều loại enzyme để phân hủy Lindane [52]. Hơn nữa, loài này còn nổi tiếng với khả năng sản xuất rhamnolipid, một chất hoạt động bề mặt sinh học giúp tăng khả năng tiếp cận Lindane [25].



Hình 3.16. Tỷ lệ phần trăm chênh lệch về hiệu quả phân giải Lindane giữa các tổ hợp chủng và các đơn chủng thành phần theo thời gian ở môi trường rắn

Tổng hợp các kết quả trên, có thể nhận thấy rằng các tổ hợp có hiệu suất phân giải Lindane tốt nhất trong các dạng môi trường khác nhau là: (i) HH2, HH3, HH4 và HH6 trong môi trường lỏng; (ii) HH4, HH5 và HH6 trong môi trường bán rắn; và (iii) HH1 và HH4 trong môi trường rắn. Xét rằng môi trường rắn gần gũi

về mặt cấu trúc với môi trường đất, theo nguyên tắc xử lý sinh học trong thực tế, chúng tôi tin rằng không nên bỏ qua các tổ hợp hoạt động tốt trong môi trường rắn. Do đó, dựa trên các kết quả, chúng tôi đã chọn HH1, HH3, HH4 và HH6 để nghiên cứu thêm. Bên cạnh đó, xét rằng HH7, chứa tất cả năm chủng thành phần, có thể mang lại tiềm năng sinh trưởng và thích nghi trong thực tế tốt hơn trong thời gian dài, chúng tôi đề xuất rằng tổ hợp này vẫn nên được nghiên cứu chi tiết và do đó nên được đưa vào danh sách lựa chọn để nghiên cứu tiếp.

3.1.3.4 Khảo sát khả năng phân giải Lindane của các tổ hợp chủng đề xuất trong các điều kiện thực tế khác nhau

Các tổ hợp có hiệu suất loại chloride tốt khi được thử nghiệm với dải nhiệt độ rộng từ 10 đến 40°C, và dải nhiệt độ tối ưu của chúng là từ 25 đến 30°C. Nhiệt độ tối ưu cho quá trình phân hủy sinh học trong đất, bùn và môi trường nuôi cấy thông thường cũng nằm trong khoảng từ 25 đến 30°C [70]. Mặt khác, các nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy các chủng *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* PAM66 phát triển và loại chloride chậm ở 10°C. Tuy nhiên, tổ hợp HH1 và HH3, chứa *Streptomyces katrae* A119, *Pseudomonas putida* PAM66 và *Pseudomonas putida* T069, có thể sinh trưởng tốt và loại chloride ổn định trong bốn điều kiện nhiệt độ, bao gồm cả những điều kiện khắc nghiệt như 10°C hoặc 40°C (Hình 3.17A). Kết quả này cho thấy việc bổ sung các chủng thành phần này có thể tăng cường khả năng thích nghi của chúng, và do đó tăng khả năng thích nghi của các tổ hợp chứa chúng với phổ nhiệt độ đa dạng.

Về ảnh hưởng của pH, kết quả cho thấy tổ hợp vi sinh vật thích nghi với phổ pH rộng từ pH5 đến pH9, với pH7 là tối ưu (Hình 3.17B). Những kết quả này phù hợp với các công bố trước đây cho thấy pH 7 là tối ưu cho vi khuẩn phân hủy Lindane [48, 64]. Trong số các tổ hợp, chỉ có HH1 và HH4 vẫn thể hiện hiệu suất loại bỏ Lindane tốt ở pH3 và 11, trong khi các tổ hợp khác hầu như không loại chloride ở các mức pH này. Do đó, HH1 và HH4 có thể thích nghi tốt hơn với các điều kiện pH môi trường khác nhau so với các tổ hợp khác.

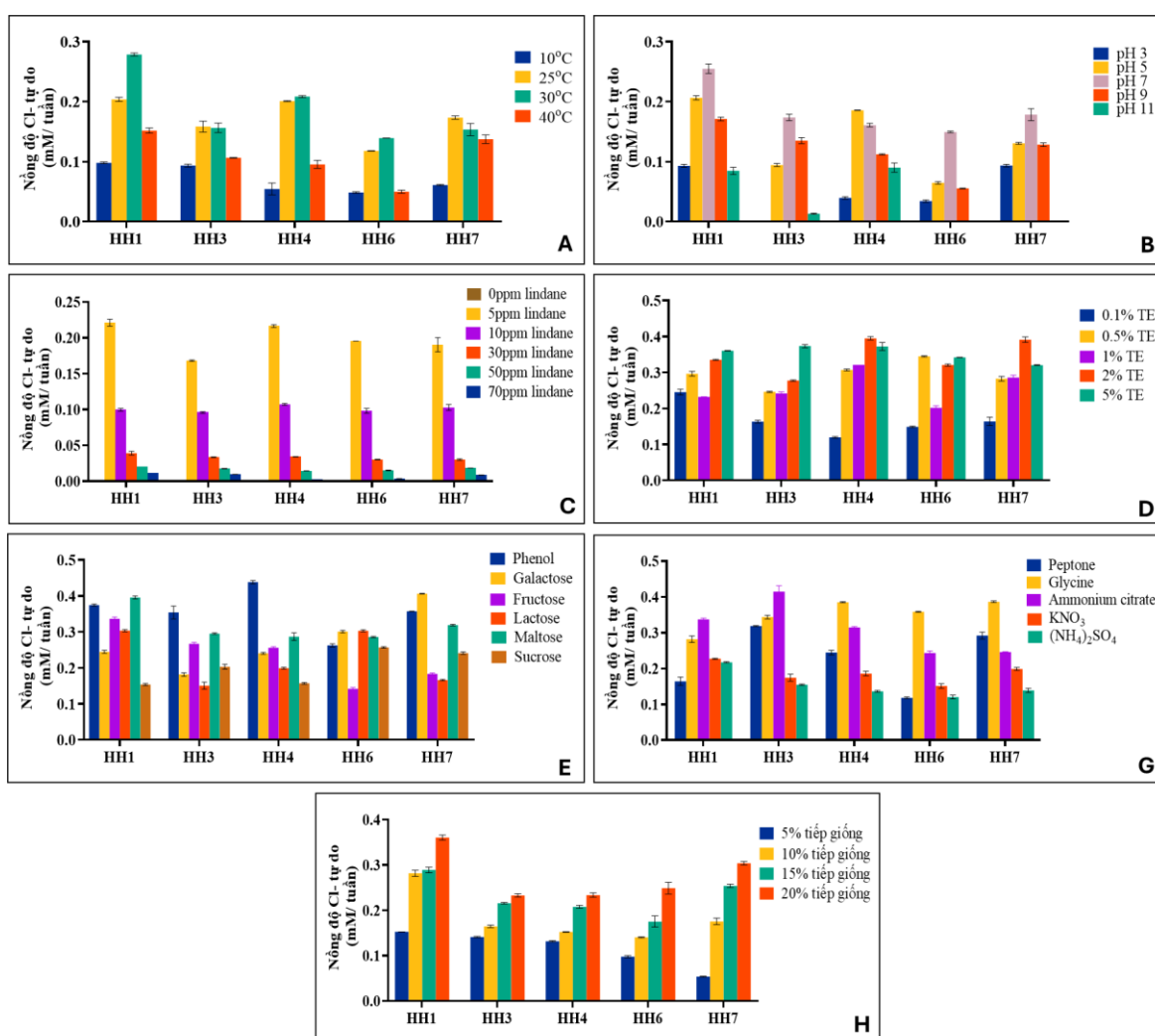
Về ảnh hưởng của nồng độ Lindane, tốc độ loại chloride của các tổ hợp được thử nghiệm khác nhau đáng kể ở năm nồng độ Lindane được thử nghiệm (Hình 3.16C). Tốc độ này cao ở nồng độ Lindane thấp. Tuy nhiên, tốc độ phân hủy giảm dần khi nồng độ tăng (30 đến 70 ppm). Dựa trên kết quả, có thể thấy HH1, HH3 và HH7 duy trì hiệu suất phân hủy Lindane ổn định hơn các tổ hợp khác ở các nồng độ lindane khác nhau, ngay cả ở 70 ppm (Hình 3.17C).

Yếu tố tiếp theo được nghiên cứu là tỷ lệ các nguyên tố vi lượng bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Kết quả cho thấy tất cả các tổ hợp đều có hoạt tính loại chloride khỏi Lindane tốt khi dung dịch chứa các nguyên tố vi lượng được bổ sung theo tỷ lệ từ 0,5 đến 2%, tuy nhiên hiệu quả nhìn chung không cao ở mức 1% (Hình 3.17D). Với tỷ lệ bổ sung là 5%, hoạt động loại chloride tăng không đáng kể và thậm chí giảm đối với một số tổ hợp HH4 và HH7. Nguyên nhân có thể do việc bổ sung một lượng lớn các nguyên tố vi lượng gây ức chế sự phát triển của vi sinh vật [76], do đó ảnh hưởng đến hoạt động loại chloride. Trong số các tổ hợp, HH1 thể hiện hiệu suất loại chloride tốt với phạm vi rộng về tỷ lệ bổ sung các nguyên tố vi lượng. Kết quả cũng cho thấy, nếu sử dụng tổ hợp cho ứng dụng thực tế, việc bổ sung 0,5% dung dịch các nguyên tố vi lượng là đủ để đảm bảo sự sinh trưởng và khả năng phân hủy sinh học hiệu quả của các tổ hợp vi sinh vật.

Ảnh hưởng của các nguồn cacbon cũng đã được nghiên cứu, và kết quả cho thấy các tổ hợp thích nghi với các nguồn cacbon khác nhau một cách khác nhau (Hình 3.17E). Tuy nhiên, tất cả chúng đều có tốc độ loại chloride cao với cả phenol và maltose. Hoạt tính như vậy với phenol cho thấy tiềm năng tốt của tổ hợp (đặc biệt là HH4) trong việc phân hủy các hợp chất thơm như Lindane. Đáng chú ý, HH4 cũng thể hiện hiệu quả loại bỏ Lindane cao nhất trong môi trường lỏng (Hình 3.17E). Mặt khác, HH1 dường như thích nghi với phổ nguồn cacbon rộng nhất.

Về ảnh hưởng của các nguồn nitơ bổ sung, các tổ hợp có thể sử dụng tất cả các loại nguồn nitơ (Hình 3.17G). Đặc biệt, chúng thể hiện hoạt tính loại chloride cao nhất khi môi trường được bổ sung pepton, glycine hoặc ammonium citrate, có thể là do các nguồn nitơ này phù hợp hơn để chúng sử dụng cho sự phát triển. Kết quả này

là có thể hiểu được vì: (i) peptone là nguồn nitơ hữu cơ giàu dinh dưỡng, cung cấp cả nguyên tố vi lượng và yếu tố tăng trưởng cho vi khuẩn, (ii) glycine là axit amin đơn giản nhất mà vi khuẩn có thể dễ dàng sử dụng, trong khi (iii) ammonium citrate có thể đóng vai trò là nguồn cacbon và nitơ, và dễ chuyển hóa vì nó là chất chuyển hóa trung tâm [70]. Trong số các tổ hợp, HH1, HH3 và HH7 dường như hoạt động tốt với tất cả các nguồn nitơ, cho thấy tiềm năng thích nghi của chúng với các nguồn nitơ đa dạng.



Hình 3.17. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến hoạt động loại chloride của các chủng vi sinh vật phân hủy Lindane được xây dựng

Ghi chú: A: nhiệt độ; B: pH; C: nồng độ Lindane; D: tỷ lệ nguyên tố vi lượng; E: nguồn cacbon; G: nguồn nitơ; H: tỷ lệ tiếp giống

Tỷ lệ tiếp giống là một yếu tố cần xem xét khi áp dụng bất kỳ chế phẩm vi sinh nào trong thực tế. Kết quả cho thấy hoạt động loại chloride của tổ hợp tăng lên cùng với sự gia tăng của tỷ lệ tiếp giống từ 5 đến 20% (Hình 3.17H). Kết quả này có thể là do vi sinh vật phát triển tốt hơn ở của tỷ lệ tiếp giống cao hơn. HH1 là tổ hợp cho thấy tỷ lệ loại bỏ chloride tốt nhất với của tỷ lệ tiếp giống từ 15 đến 20%. Xét về vấn đề chi phí, của tỷ lệ tiếp giống phù hợp cho các tổ hợp được áp dụng trong thực tế có lẽ nên nằm trong khoảng từ 10 đến 15%.

Dựa trên tất cả các kết quả trên (cho thấy ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến hiệu suất loại bỏ Lindane của các tổ hợp được thử nghiệm), chúng tôi nhận định HH1, HH3 và HH4, đặc biệt là tổ hợp HH1, là những tổ hợp nổi bật hơn cả, do chúng có khả năng thích nghi tốt nhất với nhiều điều kiện khác nhau như nhiệt độ, độ pH, nguồn cacbon và nitơ bổ sung, và nồng độ cơ chất. Tất cả các tổ hợp này đều chứa *Pseudomonas putida* T069 và *Streptomyces katrae* A119. Mặt khác, cả tổ hợp HH1 và HH4 đều chứa *Pseudomonas putida* PAM66. Hai chủng lỗi *Pseudomonas putida* T069 và *Streptomyces katrae* A119 được dự đoán là các yếu tố chính cho khả năng thích nghi rộng rãi của các tổ hợp tương ứng với các điều kiện thực tế. Qua đó có thể thấy việc xây dựng các tổ hợp chủng dựa trên phân tích genome là một cách tiếp cận hợp lý.

Như đã phân tích ở trên, bên cạnh hai chủng lỗi, *Pseudomonas putida* PAM66 là chủng có các con đường chuyển hóa phong phú nhất và có thể cung cấp nhiều tính bổ sung hơn cho hai chủng lỗi, so với các chủng hỗ trợ khác. Mặt khác, tổ hợp HH3 chứa *Sphingobacterium mizutaii* Y027, đây là chủng duy nhất thể hiện cả hoạt động loại chloride mạnh và hoạt động của enzyme oxy hóa mạnh trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Phụ lục 7). Do đó, *Sphingobacterium mizutaii* Y027 cũng có thể là một chủng rất tốt cho vai trò hỗ trợ trong các tổ hợp ở các điều kiện khác nhau. Tuy nhiên, mặt khác, chúng ta nên lưu ý rằng một số tổ hợp khác cũng chứa ba chủng *Pseudomonas putida* T069, *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* PAM66, nhưng khả năng thích nghi với môi trường của chúng không tốt bằng HH1 và HH3. Do đó, có thể sự bổ sung giữa *Pseudomonas putida* và xạ khuẩn

Streptomyces katrae đã đủ để các tổ hợp vi sinh vật thích nghi hiệu quả với điều kiện môi trường. Sự có mặt thêm của nhiều chủng khác dường như ảnh hưởng đến sự tương tác giữa hai chủng cốt lõi, theo hướng tích cực hoặc tiêu cực, dẫn đến việc tăng hoặc giảm khả năng thích nghi của tổ hợp. Xét về mọi mặt, tổ hợp HH1 dường như là tổ hợp lý tưởng với khả năng loại bỏ Lindane hiệu quả và khả năng thích nghi tuyệt vời so với các tổ hợp khác.

Các kết quả nghiên cứu trên củng cố quan điểm cần sử dụng các tổ hợp chủng vi sinh thay vì các chủng vi sinh đơn lẻ để xử lý sinh học, đặc biệt là khi xử lý các chất ô nhiễm khó phân hủy, chẳng hạn như Lindane và các hợp chất hữu cơ chứa clo khác.

3.2 Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm đa chủng

Để có một chế phẩm ứng dụng hiệu quả thì ngoài việc chủng có khả năng phân giải hiệu quả tốt thì cần nghiên cứu tối ưu quy trình sản xuất lên men để vừa hiệu quả và tiết kiệm. Do đó, cần khảo sát các điều kiện lên men, thu hồi sau lên men và bảo quản chế phẩm.

Dựa vào các kết quả đã trình bày ở trên, những tổ hợp HD4 và HD7 được lựa chọn để nghiên cứu phát triển chế phẩm phân giải DDT. Tương tự, những tổ hợp HH1 và HH3 được lựa chọn để nghiên cứu phát triển chế phẩm phân giải Lindane. Thành phần chủng cụ thể của các tổ hợp này như sau:

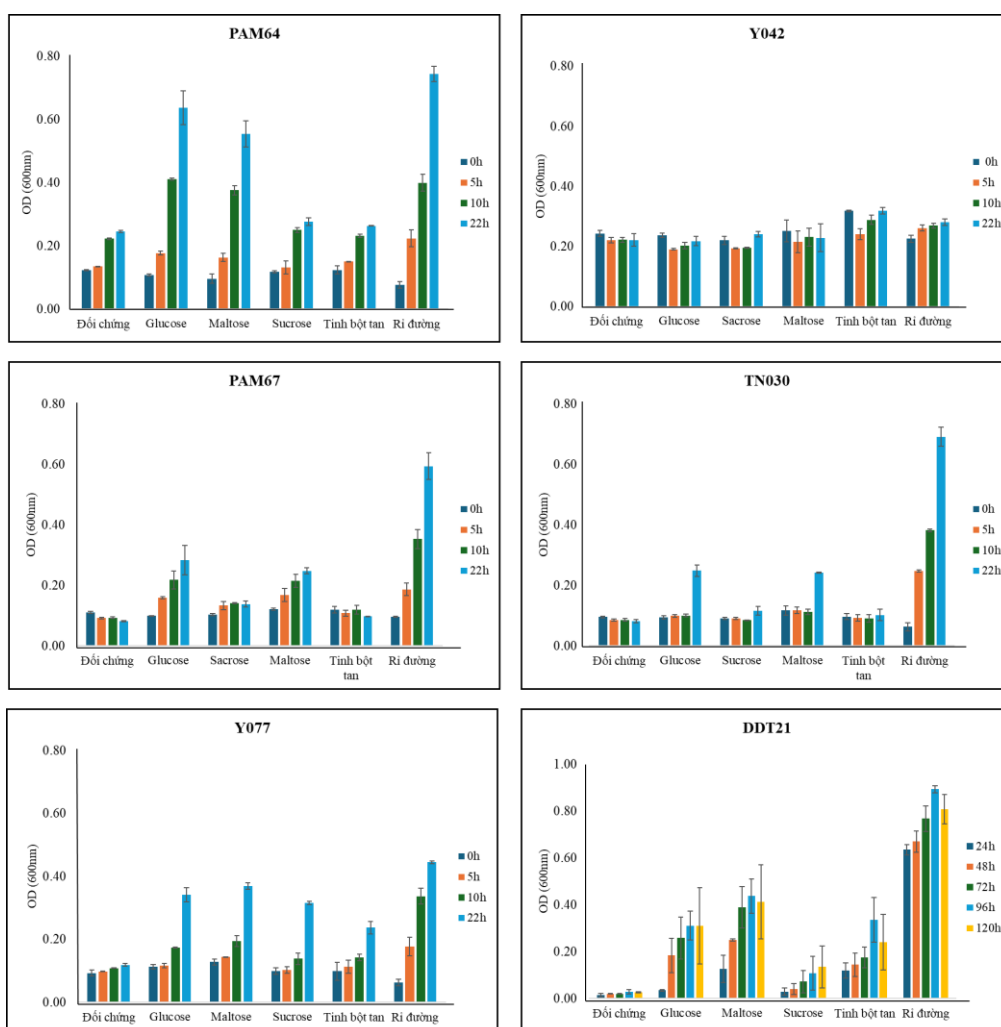
+ Chế phẩm tổ hợp phân giải DDT: (i) HD4 (gồm *Pseudomonas nitroreducens* Y077, *Stenotrophomonas maltophilia* Y042, *Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67, *Cupriavidus metallidurans* TN030 và *Streptomyces marianii* DDT21) và (ii) HD7 (gồm *Pseudomonas nitroreducens* Y077, *Pseudomonas lalkuanensis* PAM64, *Cupriavidus metallidurans* TN030 và *Streptomyces marianii* DDT21)

+ Chế phẩm tổ hợp phân giải Lindane: (i) HH1 (gồm *Pseudomonas putida* PAM66, *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* T069) và (ii) HH3 (gồm *Sphingobacterium mizutaii* Y027, *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* T069)

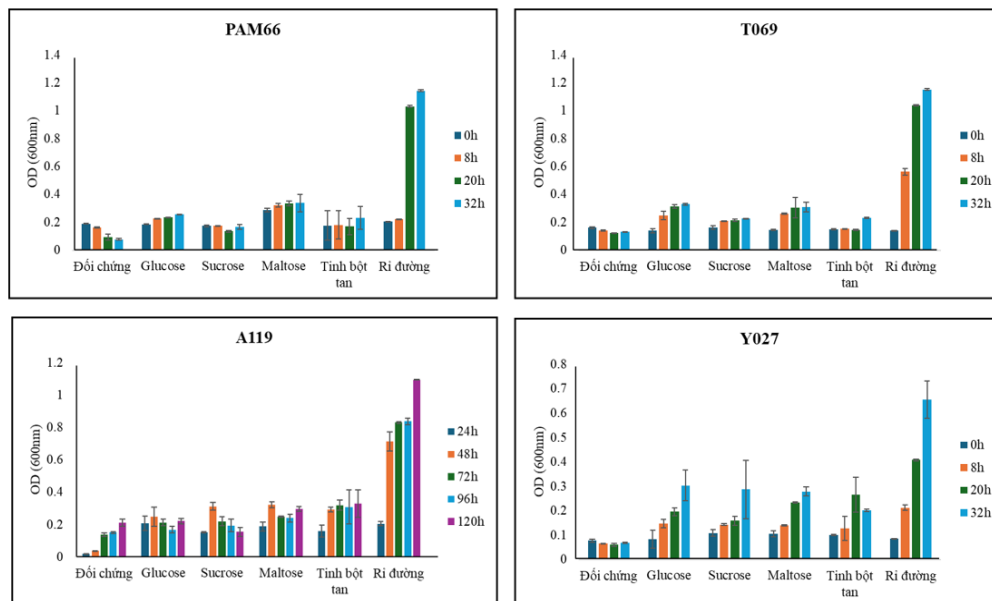
3.2.1 Nghiên cứu quy trình lên men quy mô 10L tạo chế phẩm với các chủng phân giải DDT và Lindane

3.2.1.1 Khảo sát nguồn cacbon

Cacbon là yếu tố dinh dưỡng thiết yếu cho quá trình sinh trưởng của vi sinh vật, do đó việc lựa chọn nguồn cacbon thích hợp là bước quan trọng đầu tiên. Nhằm ưu tiên những dạng cacbon đơn giản, phổ biến và dễ tiếp cận, trong thí nghiệm này, chúng tôi đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng thuộc các tổ hợp được lựa chọn trên các nguồn cacbon khác nhau gồm glucose, sucrose, maltose, tinh bột hòa tan và rỉ đường.



Hình 3.18. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn cacbon (để lên men sản xuất sinh khối quy mô lớn) đến khả năng sinh trưởng các chủng phân giải DDT



Hình 3.19. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn cacbon (để lên men sản xuất sinh khối quy mô lớn) đến khả năng sinh trưởng các chủng phân giải Lindane

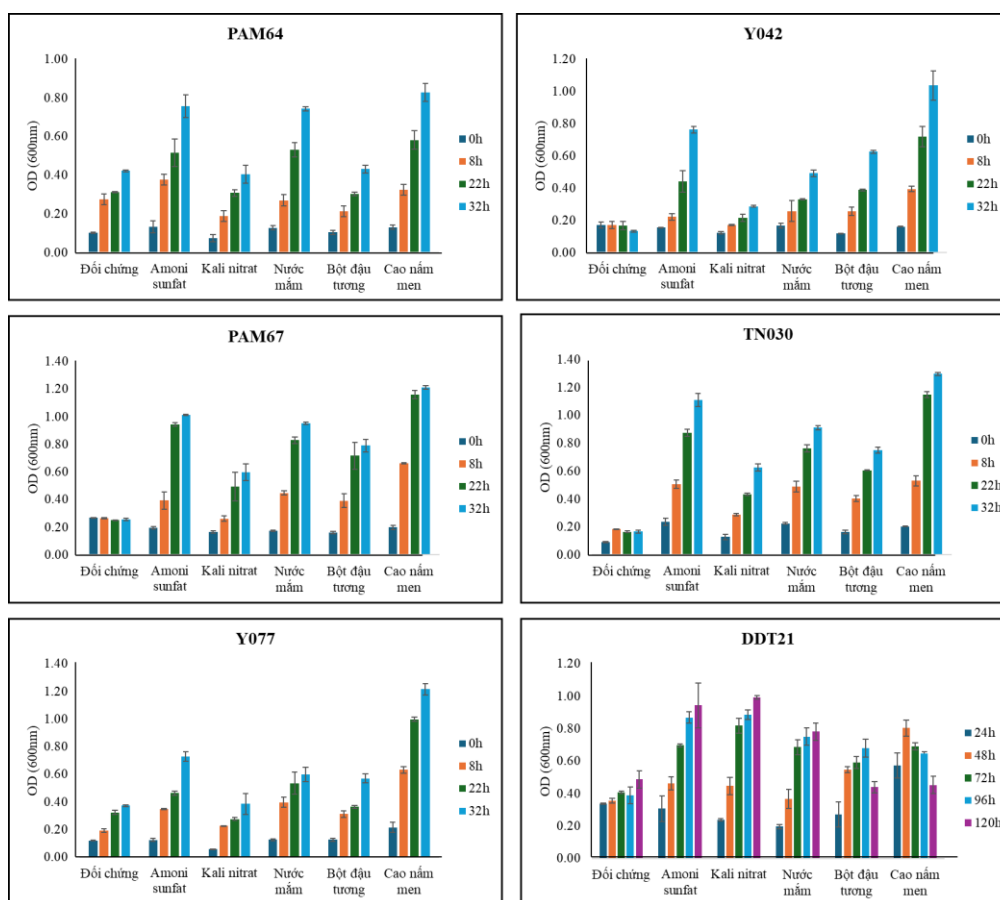
Kết quả nghiên cứu (Hình 3.18 và 3.19) cho thấy rỉ đường là nguồn cacbon tiềm năng và hiệu quả cho quá trình lên men. Theo Trương Phước Thiên Hoàng và cộng sự năm 2021, rỉ đường là nguồn cacbon tối ưu nhất để lên men thu sinh khối nhiều loại vi khuẩn [4].

Việc lựa chọn rỉ đường không chỉ góp phần giảm chi phí sản xuất mà còn phù hợp để áp dụng ở quy mô công nghiệp. Tại Việt Nam, rỉ đường là nguyên liệu phổ biến, dễ tìm và có giá thành thấp hơn nhiều so với các nguồn cacbon khác (chỉ khoảng 1/10, tương đương 10,000 – 15,000 VNĐ/kg). Đây là lựa chọn kinh tế cho quá trình lên men nhằm thu nhận sinh khối vi khuẩn. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã chứng minh rỉ đường là nguồn cacbon thuận lợi cho sự phát triển của nhiều loài vi sinh vật.

3.2.1.2 Khảo sát nguồn nitơ

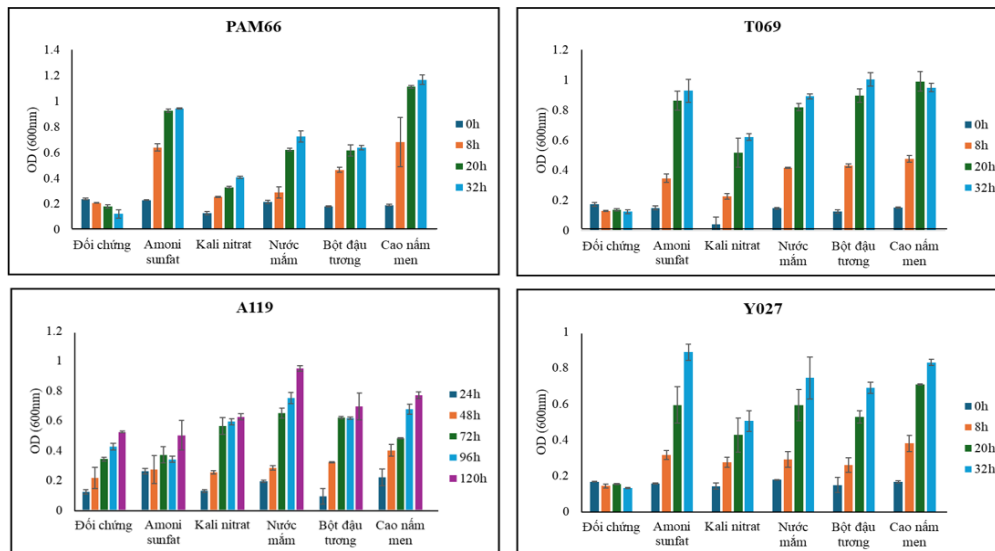
Sau khi xác định rỉ đường là nguồn cacbon thích hợp, chúng tôi tiếp tục khảo sát các nguồn nitơ theo tiêu chí đơn giản, dễ tìm và phù hợp cho quá trình lên men. Các nguồn nitơ được lựa chọn bao gồm amoni sulfat, kali nitrat, nước mắm, bột đậu tương và cao nấm men. Kết quả khảo sát các nguồn nitơ (Hình 3.19 và 3.20) cho thấy, các chủng nghiên cứu đều có khả năng sử dụng nhiều nguồn nitơ khác nhau; hầu hết

các chủng đều thích nghi tốt với các nguồn nitơ là amoni sulfate, nước mắm, bột đậu tương và cao nấm men.



Hình 3.20. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ (để lên men sản xuất sinh khối quy mô lớn) đến khả năng sinh trưởng các chủng phân giải DDT

Tuy nhiên, bột đậu tương khó tan hoàn toàn trong nước, nước mắm trên thị trường rất đa dạng khó kiểm soát chất lượng và lại có các chất phụ gia cũng như các chất bảo quản. Ngoài ra, với mục tiêu sản xuất chế phẩm ưu tiên các nguồn nguyên liệu rẻ tiền mà vẫn đảm bảo chất lượng sản phẩm ổn định, chúng tôi đề xuất lựa chọn amoni sulfate như là nguồn nitơ phù hợp cho quá trình lên men để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.



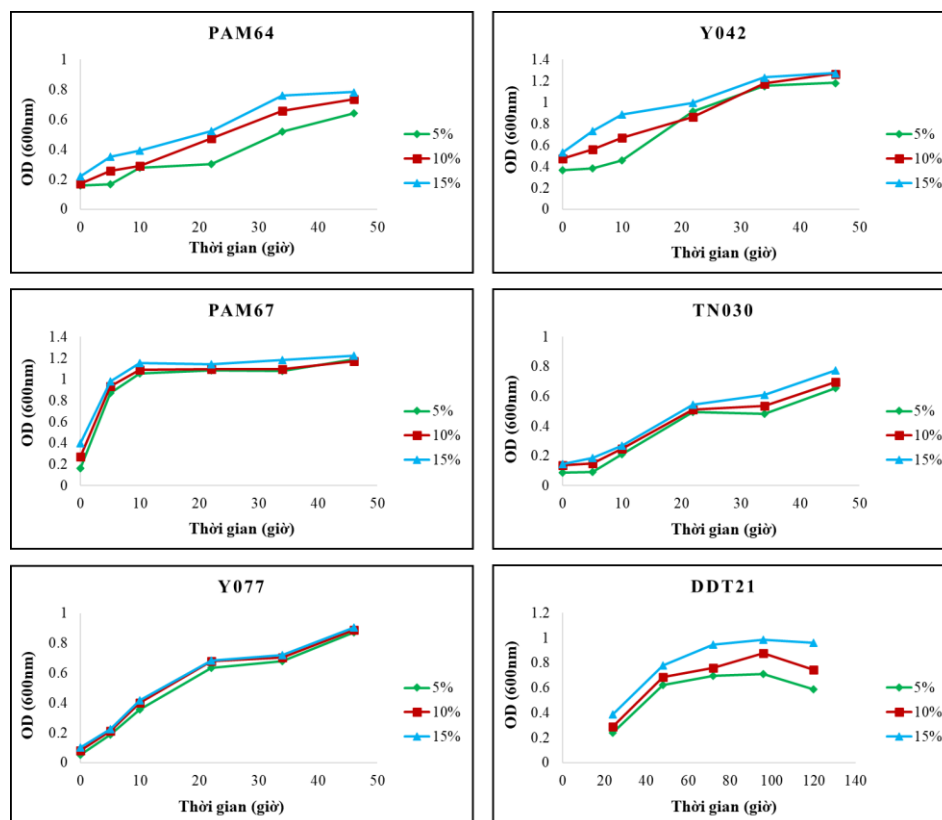
Hình 3.21. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ (để lên men sản xuất sinh khối quy mô lớn) đến khả năng sinh trưởng các chủng phân giải Lindane

Kết quả thu được phù hợp với nghiên cứu của Đoàn Thị Tuyết Lê và cộng sự (2020), trong đó amoni sunfat được xác định là nguồn nitơ tối ưu cho quá trình lên men thu sinh khối chủng *Bacillus subtilis* LH1 [5]. Do đó, môi trường muối khoáng MSM bổ sung 1% rỉ đường và 0,1% amoni sunfat được xây dựng và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

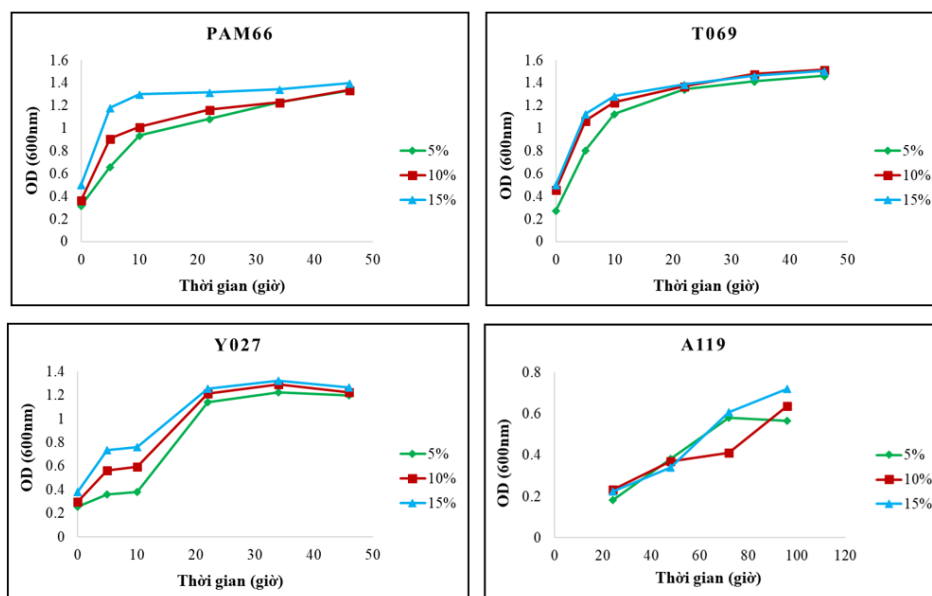
3.2.1.3 Khảo sát tỷ lệ tiếp giống

Sau khi xác định được môi trường lên men phù hợp, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống. Kết quả thí nghiệm với các chủng được nghiên cứu (Hình 3.22 và 3.23) cho thấy, khả năng sinh trưởng của các chủng khi tiếp giống với các tỷ lệ khác nhau là không đáng kể.

Vì vậy, để giảm thiểu chi phí chuẩn bị nuôi cấy giống nhằm sản xuất chế phẩm có hiệu quả kinh tế nhất, tỷ lệ tiếp giống 5% được lựa chọn để lên men. Kết quả này tương đồng với kết luận của Trương Phước Thiên Hoàng và cộng sự cho thấy bổ sung tỷ lệ cấp giống 2,5% khi lên men thì chủng *P. stutzeri* KL15 sinh trưởng và phát triển tốt [4].



Hình 3.22. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống khác nhau đến khả năng tạo sinh khối khi lên men các chủng phân giải DDT



Hình 3.23. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống khác nhau đến khả năng tạo sinh khối khi lên men các chủng phân giải Lindane

Từ các kết quả khảo sát, môi trường lên men tối ưu được thiết lập trên cơ sở môi trường muối khoáng MSM cải tiến, có bổ sung 1% rỉ đường và 0,1% amoni sulfat. Công thức này vừa đảm bảo khả năng sinh trưởng của vi khuẩn, vừa mang lại hiệu quả kinh tế. Bên cạnh đó, tỷ lệ tiếp giống 5% được xác định là thích hợp cho quá trình lên men.

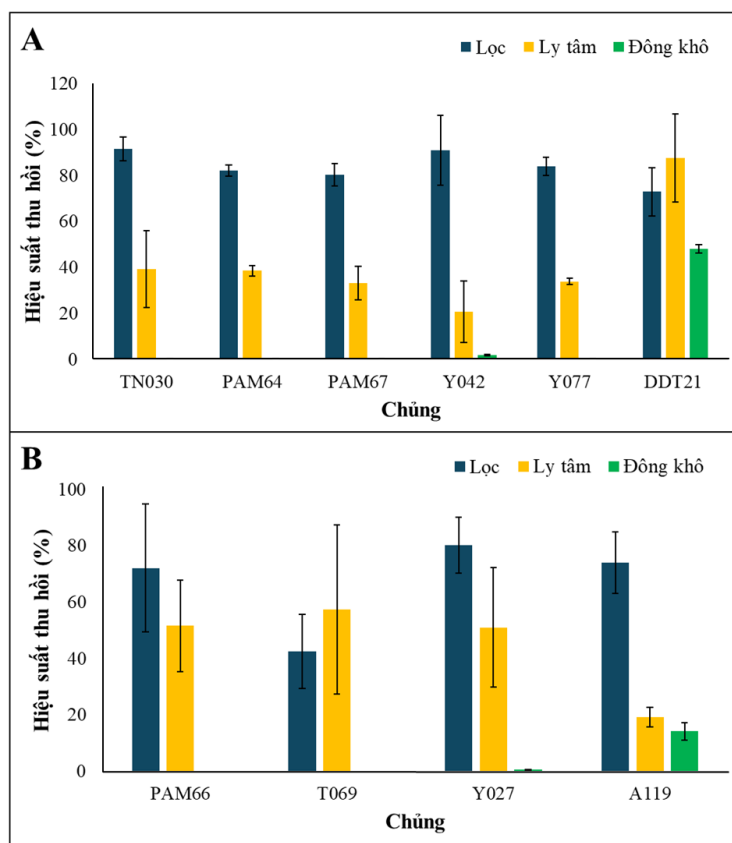
3.2.2 Nghiên cứu quy trình thu hồi sinh khối sau lên men

Sau khi xây dựng được môi trường lên men và tỷ lệ cấp giống cho vi khuẩn, tiếp theo cần nghiên cứu phương án phù hợp để thu hồi sinh khối vi khuẩn sau lên men, nhằm đảm bảo việc sản xuất sinh khối hiệu quả và kinh tế nhất. Các chủng cần nghiên cứu được thu hồi bằng 3 phương án đông khô, lọc tiếp tuyến và ly tâm.

Với phương án đông khô, hiệu suất thu hồi sinh khối các chủng vi khuẩn khá thấp, từ 0,39- 1,95% từ mật độ ban đầu lớn hơn 10^9 CFU/mL (Hình 3.24). Kết quả thu được thấp hơn một chút so với trong một số công bố khác. Ví dụ, theo Louis và cộng sự, vi khuẩn *E. coli* vẫn duy trì được 4% khả năng sống sót trong dung dịch đệm phosphate sau khi đông khô [67]. Tuy nhiên, ngay cả kết quả đó cũng nói lên rằng đông khô có hiệu suất thu hồi sinh khối không cao. Đối với chủng xạ khuẩn DDT21 và A119, hiệu quả thu hồi sinh khối sau đông khô khá cao. Có lẽ do xạ khuẩn có bào tử nên khả năng sống sót sau đông khô cao hơn. Như vậy, nhìn chung đông khô có hiệu quả thu hồi sinh khối thấp và còn là phương pháp khá tốn kém, gồm nhiều công đoạn phức tạp cần tối ưu để thu hồi sinh khối hiệu quả, và khó áp dụng để sản xuất chế phẩm trong thực tế.

Một phương án thu hồi sinh khối vi sinh vật được ứng dụng phổ biến khác là ly tâm. Kết quả (Hình 3.24) cho thấy, hiệu suất thu hồi bằng ly tâm của các chủng vi khuẩn từ 20,7- 39,5% từ mật độ ban đầu lớn hơn 10^9 CFU/mL. Trong đó, với chủng Y042, hiệu suất thu hồi là thấp nhất. Với chủng xạ khuẩn DDT21, hiệu suất thu hồi bằng ly tâm đạt cao nhất, lên đến 87,7% từ mật độ gốc ban đầu khoảng 10^6 CFU/mL nhưng với chủng A119, hiệu suất lại khá thấp. Trong quy mô công nghiệp sản xuất chế phẩm vi sinh, ly tâm là một phương pháp thường được sử dụng phổ biến để cô

đặc các tế bào, tách pha lỏng và pha rắn trong dịch nuôi cấy. Cân nhắc các kết quả trên, cũng như tính phổ biến và tính ứng dụng thực tiễn cao của phương pháp ly tâm, đây là phương án đáng cân nhắc để thu hồi sinh khối sau lên men nhằm sản xuất chế phẩm.



Hình 3.24. Hiệu suất thu hồi sinh khối các chủng sử dụng cho các phương án chế phẩm

Ghi chú: A: Những chủng phân giải DDT; B: Những chủng phân giải Lindane

Bên cạnh hai phương pháp đông khô và ly tâm, lọc cũng là một phương án thu hồi sinh khối hiệu quả. Kết quả khảo sát (Hình 3.24) cho thấy, hiệu suất thu hồi sinh khối của các chủng vi khuẩn đều trên 80% từ mật độ ban đầu lớn hơn 10^9 CFU/mL, chỉ riêng với chủng T069 thì hiệu suất là thấp nhất: hơn 40%. Chủng xạ khuẩn DDT21 và A119 cũng có hiệu suất thu hồi bằng phương pháp lọc khá cao. Phương pháp lọc tiếp tuyến có hiệu suất thu hồi cao hơn so với phương pháp ly tâm. Tuy nhiên, xét về chi phí và sự phức tạp của máy móc thì phương án ly tâm được ưu tiên lựa chọn hơn.

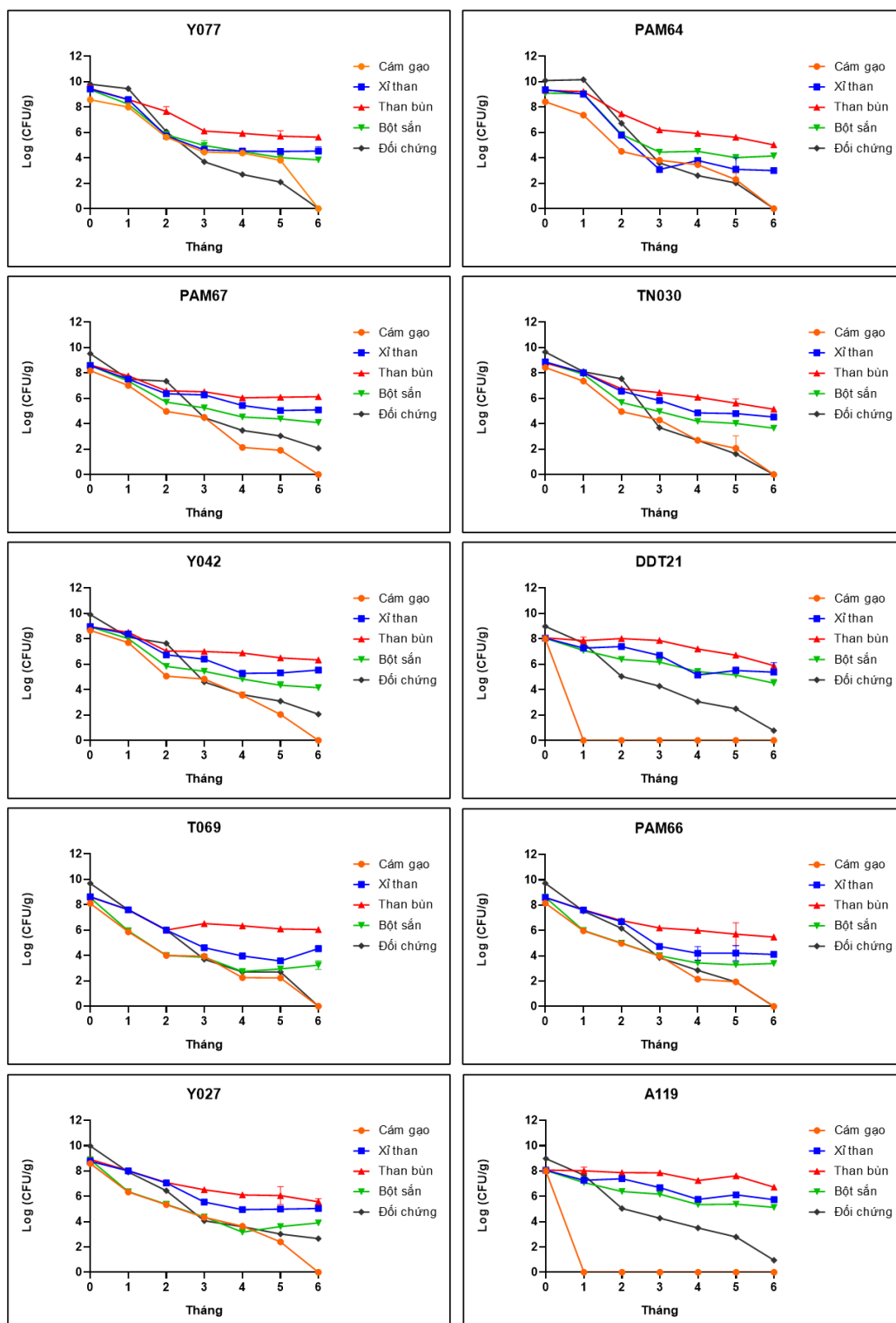
Tổng hợp các kết quả trên, có thể thấy phương pháp đông khô có hiệu quả thấp nhất; trong khi đó, lọc, đặc biệt là lọc tiếp tuyến, đạt hiệu suất thu hồi sinh khối cao nhất đối với tất cả các chủng, cao gấp 2–3 lần so với ly tâm. Mặc dù vậy, ly tâm vẫn là kỹ thuật phổ biến, dễ triển khai trong thực tiễn và cho hiệu quả thu hồi ở mức chấp nhận được. Do đó, tùy theo điều kiện thiết bị và mục tiêu sản xuất, cả lọc và ly tâm đều có thể được xem là những lựa chọn khả thi cho quá trình thu hồi sinh khối vi khuẩn sau lên men. Đồng thời, các kết quả thu được cũng khẳng định tiềm năng ứng dụng thực tiễn của các chủng được tuyển chọn nhờ khả năng thu hồi sinh khối cao.

3.2.3 Nghiên cứu chất mang phù hợp để bảo quản sinh khối

Sau khi thu nhận sinh khối vi khuẩn từ quá trình lên men, việc lựa chọn chất mang phù hợp để bảo quản là yếu tố then chốt. Trong nghiên cứu này, bốn loại chất mang phổ biến và dễ tìm gồm bột sắn, cám gạo, than bùn và xỉ than đã được khảo sát. Hiệu quả bảo quản của chúng được đánh giá thông qua khả năng duy trì sự sống sót và hoạt tính của các chủng được lựa chọn theo thời gian khi được phối trộn với các chất mang trên.

3.2.3.1 Khảo sát ảnh hưởng của chất mang đến khả năng sống sót

Kết quả khảo sát khả năng sống sót của các chủng với các chất mang khác nhau (Hình 3.25) cho thấy, chất mang tốt nhất là than bùn, tiếp đó là xỉ than hoặc tinh bột sắn, và kém nhất là cám gạo. Cụ thể, sau 6 tháng, mật độ các chủng với chất mang than bùn duy trì ở $10^6 - 10^7$ CFU/g. Than bùn do có tính chất xốp, mịn, khô và hàm lượng dinh dưỡng tương đối ổn định nên giúp tạo môi trường vi mô ổn định giúp vi khuẩn duy trì lâu dài. Trong khi đó, xỉ than cứng hơn, không tơi xốp, dinh dưỡng nghèo, trơ hơn than bùn. Tinh bột sắn và cám gạo thì có hàm lượng dinh dưỡng cao nên có lẽ dễ bị phân hủy, khiến tế bào vi sinh vật phát triển và chết khi môi trường hết dinh dưỡng. Hơn nữa, than bùn phân hủy rất chậm, không gây chua hóa hay khí đột ngột, do đó có tác dụng bảo quản vi khuẩn tốt hơn. Kết quả này cũng tương tự kết quả của một nghiên cứu khác cho thấy chất mang than bùn thể hiện hiệu quả duy trì mật độ và hoạt tính của vi sinh vật theo thời gian là cao nhất [6].



Hình 3.25. Kết quả khảo sát mật độ của các chủng vi sinh vật thử nghiệm theo thời gian khi được phối trộn với các loại chất mang khác nhau.

Ghi chú: Đối chứng: sinh khối chủng tương ứng không được trộn chất mang

3.2.3.2 Khảo sát ảnh hưởng của chất mang đến khả năng loại chloride

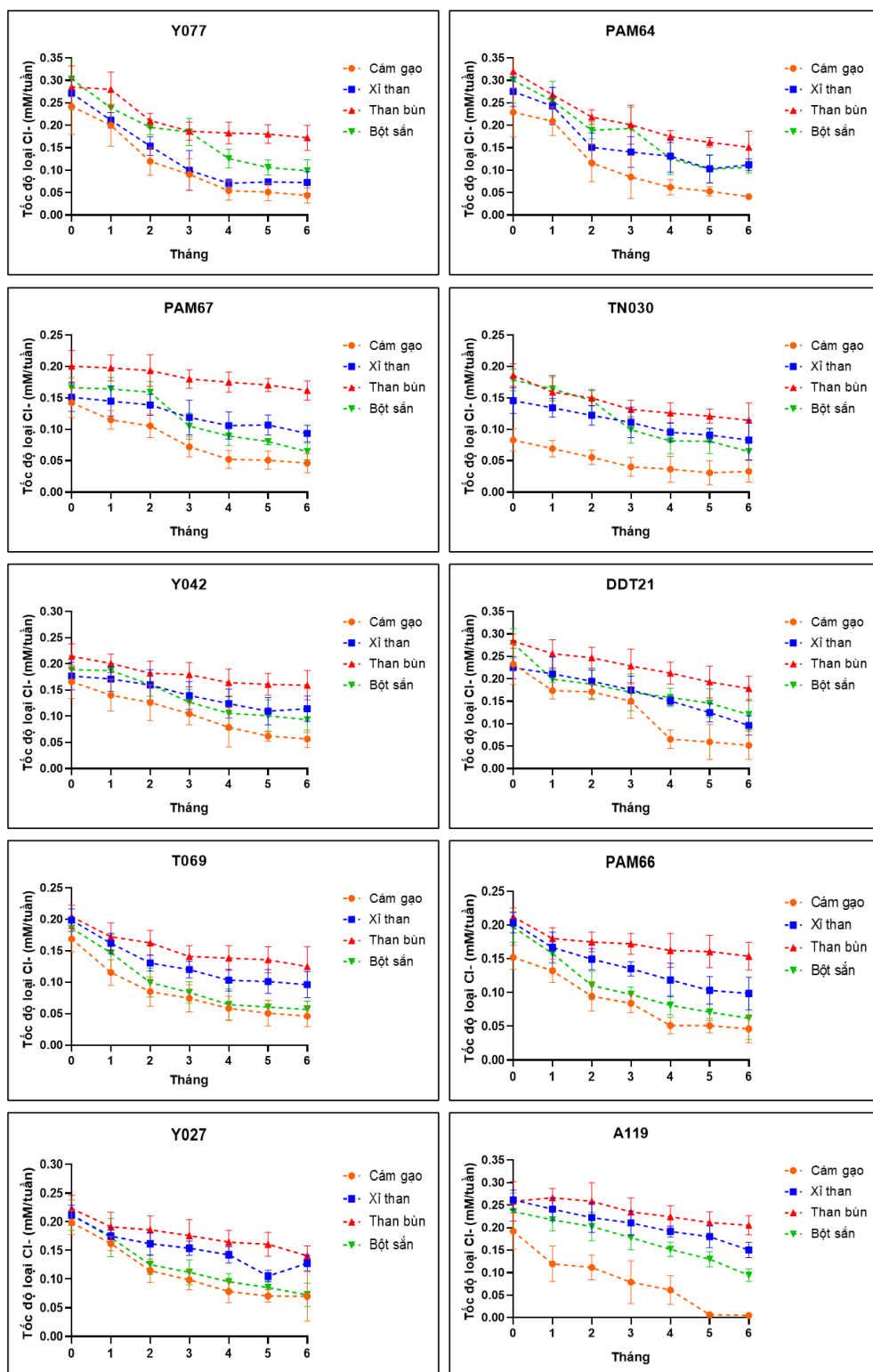
Ngoài việc khảo sát khả năng sống sót theo thời gian của các chủng khi được phối trộn với các chất mang thì hoạt tính phân giải DDT hoặc Lindane cũng được đánh giá thông qua khả năng loại chloride.

Kết quả được biểu diễn ở Hình 3.26, ở hầu hết các chủng khi được phối trộn với chất mang than bùn duy trì hoạt tính loại chloride ở mức cao nhất trong suốt thời gian theo dõi, cho thấy đây là điều kiện bảo quản phù hợp nhất. Ngược lại, chất mang cám gạo giảm nhanh nhất và đạt giá trị thấp nhất ở cuối thời gian bảo quản.

Trong giai đoạn đầu bảo quản, hoạt tính loại chloride giảm tương đối nhanh ở tất cả các chất mang thử nghiệm, đặc biệt trong khoảng ba tháng đầu tiên. Sau đó, tốc độ giảm có xu hướng chậm lại và dần ổn định, cho thấy quần thể vi sinh vật còn lại đã thích nghi tốt hơn với điều kiện bảo quản.

Xu hướng biến động hoạt tính loại chloride thu được hoàn toàn tương đồng với kết quả đánh giá khả năng sống sót của các chủng vi sinh vật. Điều này cho thấy mật độ tế bào sống có mối liên hệ chặt chẽ với khả năng biểu hiện hoạt tính phân giải các hợp chất hữu cơ chứa chlorine. Khi mật độ vi sinh vật giảm, số lượng tế bào tham gia tổng hợp enzyme phân giải cũng giảm theo, dẫn đến sự suy giảm hoạt tính loại chloride. Ngược lại, ở những chất mang có khả năng duy trì mật độ tế bào cao, hoạt tính sinh học của các chủng cũng được bảo tồn tốt hơn.

Đáng chú ý, than bùn không chỉ giúp duy trì mật độ tế bào sống cao và ổn định mà còn bảo toàn được hoạt tính loại chloride ở mức cao nhất. Có lẽ chính khả năng giữ mật độ vi khuẩn ổn định của than bùn đã góp phần chủ yếu duy trì hoạt tính sinh học loại chloride của các chủng. Nhìn chung, kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả của chất mang không chỉ thể hiện ở khả năng bảo vệ tế bào sống mà còn ở khả năng duy trì hoạt tính chức năng của vi sinh vật.



Hình 3.26. Kết quả khảo sát khả năng loại chloride của các chủng vi sinh vật thử nghiệm theo thời gian khi được phối trộn với các loại chất mang khác nhau

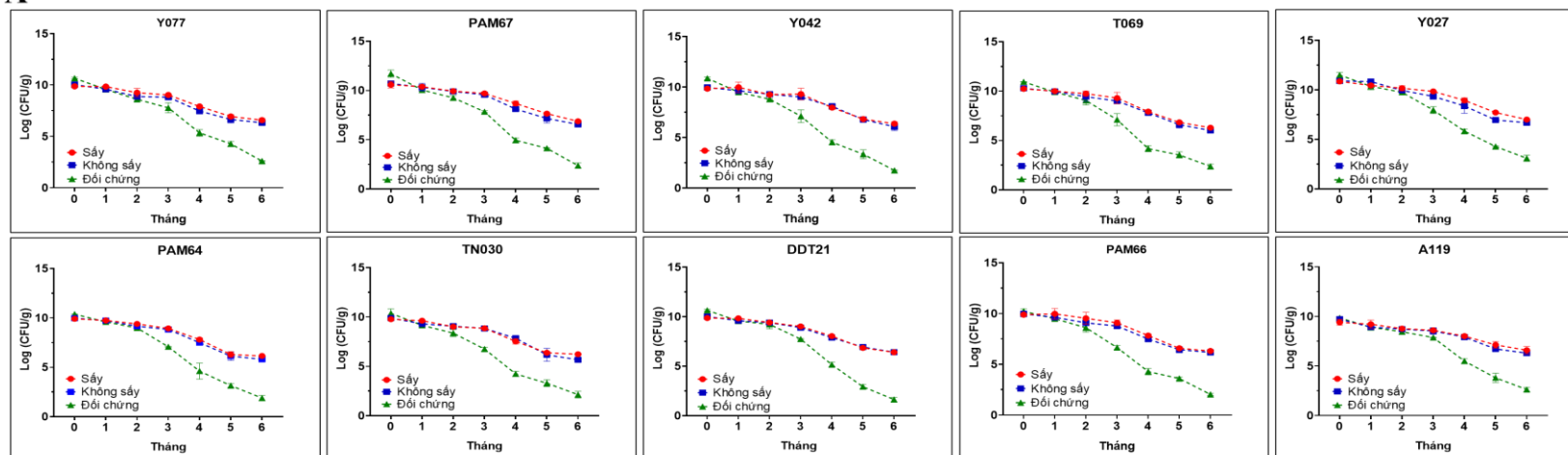
Với các kết quả trên, chúng tôi quyết định lựa chọn than bùn là chất mang tối ưu để tạo chế phẩm với tất cả các phương án. Có thể nói đây là sự lựa chọn rất hợp lý vì than bùn là vật liệu dễ kiếm, giá rẻ, trong khi lại có hiệu quả bảo quản sinh khối cao.

3.2.3.3 Cải tiến công thức chất mang nâng cao hiệu quả bảo quản

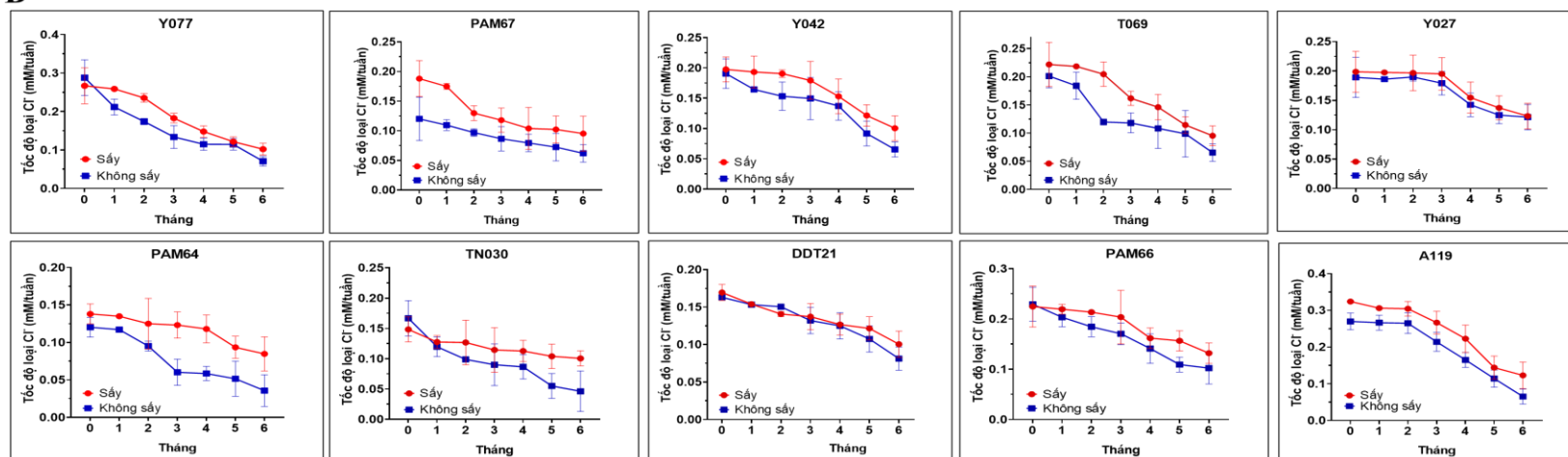
Từ kết quả khảo sát tại mục 3.2.3, mặc dù than bùn được xác định là chất mang tối ưu nhất, song mật độ tế bào sau 6 tháng bảo quản vẫn có xu hướng sụt giảm mạnh, chỉ còn khoảng 10^6 CFU/g (thậm chí thấp hơn ở một số chủng). Bên cạnh đó, chi phí cao của silica cũng là một rào cản cho việc ứng dụng thực tiễn ở quy mô lớn. Để khắc phục các hạn chế này, chúng tôi đã tiến hành cải tiến công thức chế phẩm bằng cách loại bỏ hoàn toàn silica và bổ sung công đoạn sấy sau phối trộn.

Kết quả được trình bày ở Hình 3.27 cho thấy sự cải thiện rõ rệt về mật độ vi sinh vật khi sấy chế phẩm so với không sấy duy trì ổn định trên 10^6 CFU/g sau 6 tháng bảo quản, đồng thời hoạt tính loại chloride vẫn được bảo toàn tốt so với lô đối chứng. Đặc biệt, hoạt tính loại chloride được duy trì tốt hơn khi sấy. Quy trình sấy chế phẩm áp dụng nhằm đạt độ ẩm còn lại 4–6 % giúp duy trì mật độ tế bào và hoạt tính các chủng vi sinh vật ổn định sau 6 tháng bảo quản, đảm bảo hiệu lực sinh học lâu dài – phù hợp với tiêu chuẩn chế phẩm vi sinh thương mại ($>7,0 \lg$ CFU/g trong 6 tháng) [129]. García-Rodríguez và cộng sự (2022) đã chuẩn bị chế phẩm khô với độ ẩm dư ≤ 5 % bằng bước sấy nhẹ trước khi bảo quản ở 4°C và 25°C ; sau 6 tháng, mẫu có sấy duy trì $>6,0 \log$ CFU/g, trong khi mẫu “ướt” giảm xuống $<5,0 \log$ CFU/g [11]. Áp dụng bước sấy ngắn ở nhiệt độ vừa phải giúp giảm hoạt động của nước, giảm áp lực thẩm thấu và quá trình oxy hóa, đồng thời bảo toàn chức năng enzym [78]. Quy trình cải tiến sấy 40°C trong 3 giờ sau khi trộn chế phẩm vừa tiết kiệm chi phí và hiệu quả bảo quản giúp duy trì mật độ và hoạt tính tốt hơn công thức có bổ sung silica. Do đó, quy trình này được lựa chọn để sản xuất các chế phẩm phục vụ cho các thử nghiệm xử lý DDT và Lindane tiếp theo.

A



B



Hình 3.27. (A) Khả năng sống sót và (B) hoạt tính loại chloride của các chủng vi sinh vật thử nghiệm theo thời gian

Ghi chú: Đối chứng: sinh khối chủng tương ứng không được trộn chất mang

3.2.4 Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dạng tổ hợp chủng từ các đơn chủng

Dựa vào những kết quả nghiên cứu ở trên, quy trình sản xuất chế phẩm đã được xây dựng như sau:

Các chủng vi khuẩn được hoạt hóa và lên men cấp 1 trong môi trường LB ở 30°C, lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ. Đối với các chủng xạ khuẩn, quá trình lên men cấp 1 được thực hiện trong môi trường ISP2 ở 30°C, lắc 150 vòng/phút trong 48 giờ. Sau đó, dịch huyền phù được cấy chuyển với tỷ lệ 5% sang môi trường lên men MSM bổ sung rỉ đường để tiến hành lên men cấp 2 trong điều kiện khuấy 50 vòng/phút, sục khí 1,5 lít/lít môi trường/phút ở 30°C trong 40 giờ. Sinh khối sau lên men đạt yêu cầu khi giá trị OD_{600nm} khoảng 1,2, tương đương mật độ vi khuẩn khoảng 5×10^9 CFU/mL và xạ khuẩn khoảng 1×10^8 CFU/mL. Sinh khối được thu hồi bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút hoặc lọc qua màng lọc kích thước lỗ 0,2 µm.

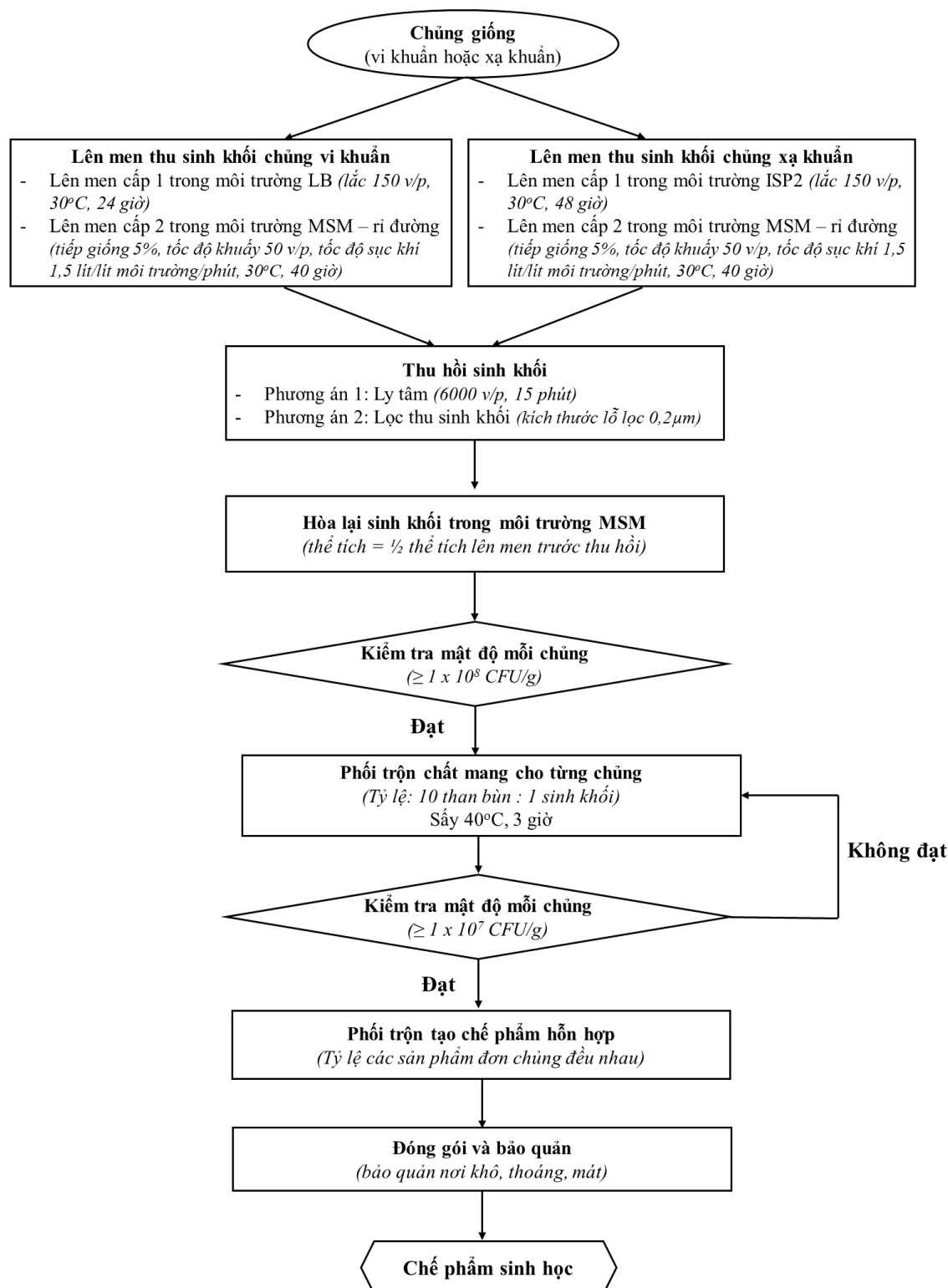
Để tạo chế phẩm, sinh khối được hòa lại trong môi trường MSM lỏng với thể tích bằng một nửa thể tích dịch lên men ban đầu nhằm tạo dịch sinh khối cô đặc. Dịch sinh khối sau đó được phối trộn với chất mang than bùn theo tỷ lệ 10 than bùn : 1 sinh khối, rồi sấy ở 40°C trong 3 giờ.

Than bùn sử dụng làm chất mang được xử lý bằng cách loại bỏ tạp chất cơ học qua rây 0,5 mm để thu than bùn mịn. Sau đó, than bùn được sấy khô ở 60°C và khử trùng ở 110°C trong 20 phút (lặp lại hai lần), sau đó sấy lại đến khi độ ẩm dưới 10%.

Chế phẩm đơn chủng sau khi tạo thành được kiểm tra mật độ vi sinh vật bằng phương pháp cấy trải trên môi trường LB đối với vi khuẩn và môi trường YS đối với xạ khuẩn. Chế phẩm đạt yêu cầu khi mật độ vi sinh vật $\geq 1 \times 10^7$ CFU/g. Trường hợp mật độ chưa đạt, sinh khối sẽ được phối trộn lại với chất mang để điều chỉnh mật độ phù hợp.

Cuối cùng, các chế phẩm đơn chủng đạt tiêu chuẩn được phối trộn theo tỷ lệ khối lượng bằng nhau để tạo chế phẩm tổ hợp. Sản phẩm được đóng gói trong túi kín, hàn miệng bao và bảo quản ở nơi khô ráo, nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Quy trình sản xuất chế phẩm được minh họa như sơ đồ Hình 3.28 như sau:



Hình 3.28. Sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm

3.3 Nghiên cứu xây dựng quy trình xử lý đất ô nhiễm DDT và Lindane bằng chế phẩm sinh học và bước đầu thử nghiệm trên mô hình thực tế

Sau khi xây dựng được quy trình sản xuất các chế phẩm sinh học có tiềm năng phân hủy DDT và Lindane, bước tiếp theo là tiến hành các thử nghiệm, xác định phương án hiệu quả nhất xử lý ô nhiễm DDT và Lindane trong đất trên cơ sở sử dụng các chế phẩm tạo được. Để đạt được mục tiêu này, các yếu tố như tỷ lệ bổ sung nước, tỷ lệ chế phẩm, các phương án bổ sung các chất hoạt động bề mặt sẽ được khảo sát ở quy mô phòng thí nghiệm. Trên cơ sở đó, phương án xử lý tốt nhất được xây dựng, và sau đó được thử nghiệm trên các mô hình thực địa.

3.3.1 Thử nghiệm xử lý ô nhiễm đất DDT ở quy mô phòng thí nghiệm

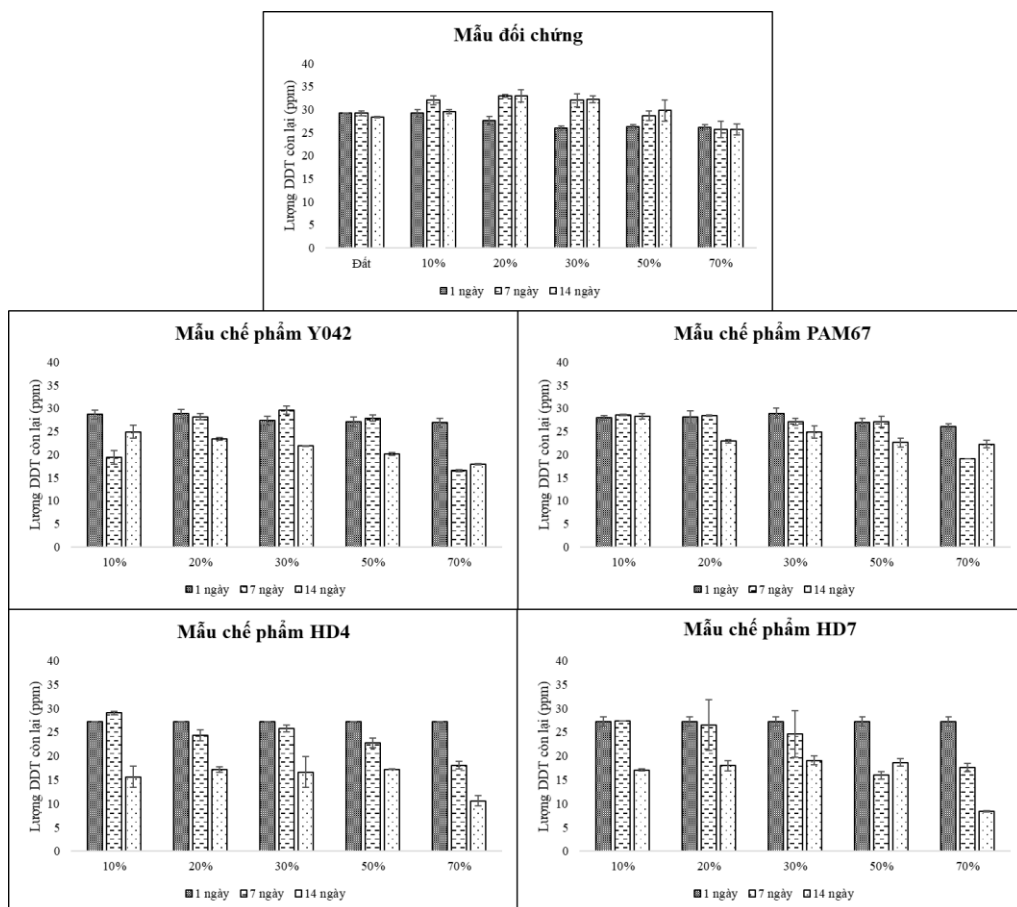
Trên cơ sở tổng hợp các kết quả nêu trên về khả năng sống sót, duy trì hoạt tính phân giải DDT của các chủng trong quá trình sản xuất, chúng tôi lựa chọn hai chế phẩm sinh học đơn chủng tốt nhất (*Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67 và *Stenotrophomonas maltophilia* Y042) làm đối chứng để khảo nghiệm tiếp cùng với các chế phẩm tổ hợp chủng tốt nhất (HD4 và HD7).

3.3.1.1 Khảo sát tỷ lệ nước khác nhau

Trong các yếu tố thì nước là yếu tố quan trọng có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng và hoạt động của các chủng vi khuẩn. Do đó, khả năng xử lý đất ô nhiễm DDT của các chế phẩm sinh học đơn chủng (*Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67 và *Stenotrophomonas maltophilia* Y042) và các chế phẩm dạng tổ hợp chủng có hiệu quả cao nhất (HD4 và HD7) được khảo sát trong điều kiện bổ sung nước ở các mức khác nhau (10, 20, 30, 50 và 70%). Kết quả (Hình 3.29) cho thấy hiệu suất phân hủy DDT gia tăng tỷ lệ thuận với lượng nước bổ sung, đạt giá trị cao nhất ở mức 70%. Cụ thể, *P. anuradhapurensis* PAM67 loại bỏ khoảng 20% DDT, *S. maltophilia* Y042 khoảng 30%, trong khi HD4 và HD7 lần lượt đạt tới 67% và 70% chỉ sau 2 tuần. Từ những kết quả này, có thể đưa ra giả thuyết rằng hàm lượng nước cao tạo điều kiện kỵ khí, giúp các chủng vi khuẩn phân hủy DDT hiệu quả hơn thông qua con đường loại halogen – vốn có thể là cơ chế chính trong điều kiện tự nhiên. Đáng chú

ý, hai chi *Pseudomonas* và *Stenotrophomonas* đã được ghi nhận có khả năng sinh trưởng linh hoạt trong cả môi trường hiếu khí và kỵ khí, điều này càng củng cố cho giả thuyết trên. Ngoài ra, nghiên cứu của Xiaoxu Wang và cộng sự (2018) cũng cho thấy việc bổ sung 60% nước vào đất tạo môi trường thuận lợi cho quá trình phân hủy DDT bởi *A. globiformis* [119].

Các kết quả thu được cho thấy ảnh hưởng của độ ẩm đối với cả chế phẩm đơn chủng và chế phẩm tổ hợp có xu hướng tương đồng. Điều này hàm ý rằng cơ chế trao đổi chất của các chủng vi sinh không thay đổi nhiều dù tồn tại ở dạng riêng lẻ hay trong tổ hợp.



Hình 3.29. Khả năng xử lý DDT trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung nước theo các tỷ lệ khác nhau

Với trường hợp tổ hợp HD4 chứa cả hai chủng *P. anuradhapurensis* PAM67 và *S. maltophila* Y042, xu thế ảnh hưởng của độ ẩm có thể được giải thích dễ dàng,

nhưng với HD7 – không bao gồm hai chủng này – xu hướng này vẫn được duy trì, cho thấy đây có thể là đặc điểm chung của tất cả các chủng được nghiên cứu. Cụ thể, khi độ ẩm tăng, hiệu quả phân giải DDT cũng tăng, đạt cao nhất ở mức 70%. Điều này gợi ý rằng điều kiện kị khí tăng cùng với độ ẩm cao có thể thúc đẩy quá trình phân giải. Như vậy, con đường kị khí nhiều khả năng là cơ chế chủ đạo trong xử lý DDT.

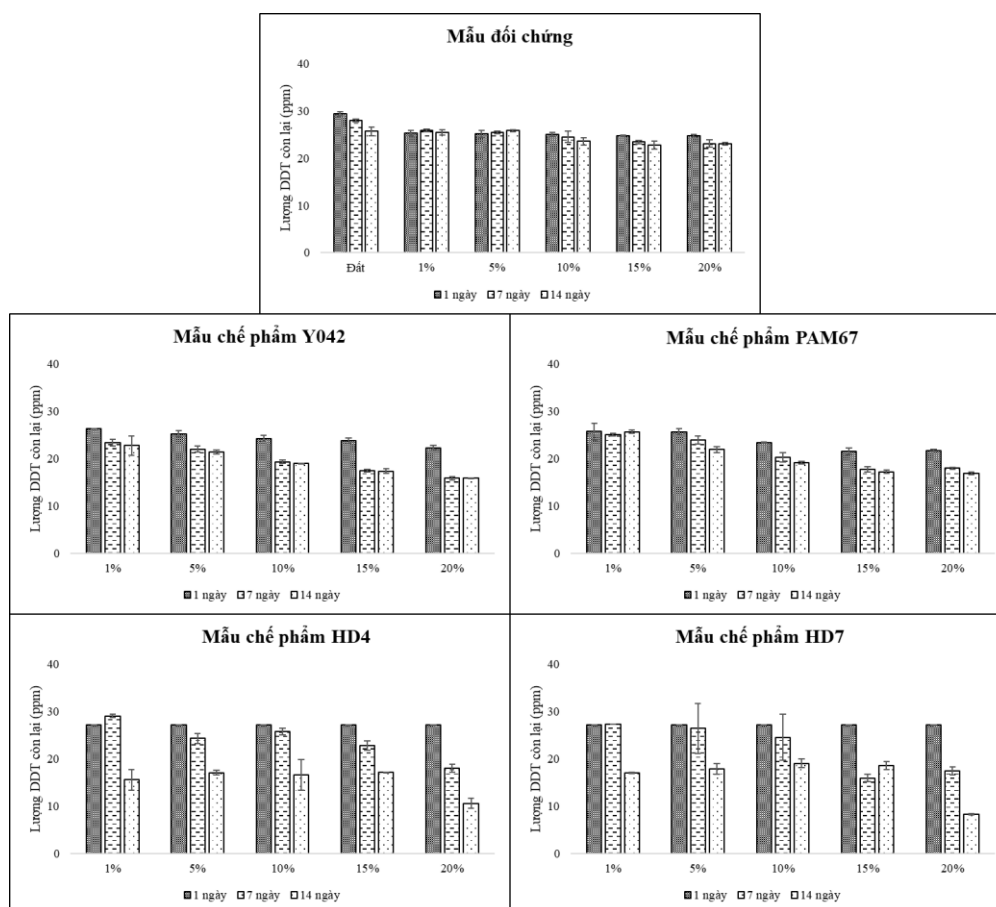
Từ kết quả trên, chúng tôi đề xuất mức bổ sung nước 70% là tối ưu cho các chế phẩm và được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.1.2 Khảo sát tỷ lệ chế phẩm khác nhau

Tỷ lệ nước tối ưu 70% xác định ở trên được áp dụng trong thí nghiệm tiếp theo là đánh giá ảnh hưởng của các tỷ lệ bổ sung chế phẩm khác nhau (1%, 5%, 10%, 15% và 20%) đến hiệu quả xử lý DDT của các chế phẩm. Kết quả (Hình 3.30) cho thấy đối với chế phẩm đơn chủng, việc tăng dần tỷ lệ bổ sung không mang lại sự cải thiện rõ rệt về hiệu quả phân giải. Sau 14 ngày, hiệu quả xử lý DDT ở các mức 10%, 15% và 20% gần như tương đương nhau, trong khi ở tỷ lệ thấp hơn 10%, quá trình phân hủy diễn ra chậm đáng kể. Đặc biệt, khi chỉ bổ sung 1% chế phẩm, nồng độ DDT hầu như không thay đổi. Đáng chú ý, với các chế phẩm tổ hợp, tỷ lệ bổ sung 5% lại cho hiệu quả cao nhất, với cả HD4 và HD7 đều đạt mức phân hủy khoảng 60% sau 2 tuần. Khi tăng tỷ lệ bổ sung trên 5%, hiệu quả xử lý không tăng mà thậm chí giảm, đặc biệt ở mức 20%. Xu hướng này khác biệt so với các chế phẩm đơn chủng. Tổng hợp kết quả cho thấy, tỷ lệ bổ sung 10% được xem là phù hợp cho cả hai chế phẩm đơn chủng: *P. anuradhasurensis* PAM67 phân hủy khoảng 30% và *S. maltophila* Y042 khoảng 35% DDT sau 4 tuần.

Với các chế phẩm tổ hợp chủng, có lẽ việc bổ sung lượng đầu vào vừa phải (5%) giúp các chủng VSV trong tổ hợp phát triển và hình thành một quần xã trong đất phân giải hiệu quả hơn so với khi bổ sung quá nhiều chế phẩm đầu vào. Việc bổ sung quá nhiều chế phẩm đầu vào (>10%) có lẽ đã dẫn đến việc cường bức tạo ra một

quần xã có thành phần cố định (tỷ lệ số lượng tế bào các chủng gần bằng nhau), mà chưa chắc đã tối ưu cho việc phân giải DDT.



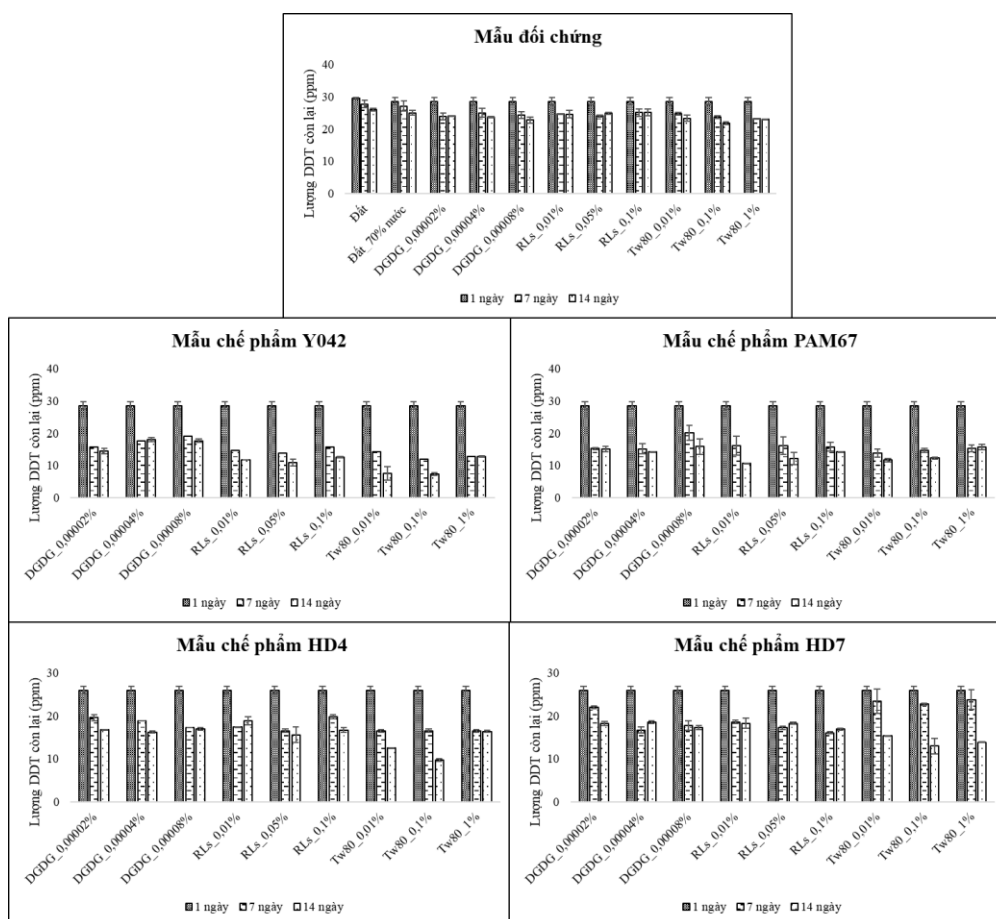
Hình 3.30. Khả năng xử lý DDT trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung tỷ lệ chế phẩm khác nhau

Do đó, có thể thấy, để xử lý DDT, nếu sử dụng chế phẩm đơn chủng thì nên chọn tỷ lệ bổ sung chế phẩm khoảng 10%, còn nếu sử dụng chế phẩm tổ hợp thì có thể chỉ cần bổ sung khoảng 5%, phần nào thể hiện lợi thế về tính kinh tế hơn.

3.3.1.3 Khảo sát các chất hoạt động bề mặt khác nhau

DDT là hợp chất ô nhiễm có tính kỵ nước, dễ bị hấp phụ vào các hạt đất, từ đó làm giảm khả năng tiếp cận và phân hủy của vi khuẩn. Vì vậy, để nâng cao hiệu quả xử lý, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát tác động của các chất hoạt động bề mặt nhằm hỗ trợ vi sinh vật tiếp xúc tốt hơn với DDT trong đất. Ba loại chất hoạt động bề mặt

được lựa chọn để khảo sát bao gồm: Tween 80 (Tw80) – một chất phổ biến, dễ kiếm – ở các nồng độ 0,01%; 0,1% và 1%; Rhamnolipids (RLs) – hợp chất do nhiều loài vi sinh vật sinh tổng hợp - ở các nồng độ 0,01%; 0,1% và 1%; và Digalactosyl Diglyceride (DGDG) – thuộc nhóm glycolipid, có nguồn gốc sinh học từ một số loài sinh vật – ở các nồng độ 0,00002%; 0,00004% và 0,00008%. Hiệu quả phân giải DDT của các chế phẩm được đánh giá khi thử nghiệm các phương án bổ sung các chất hoạt động bề mặt khác nhau, dưới điều kiện tỷ lệ nước 70% và tỷ lệ bổ sung chế phẩm 10% đối với dạng đơn chủng và 5% đối với dạng tổ hợp, được xác định là phù hợp nhất ở trên.



Hình 3.31. Khả năng xử lý DDT trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung chất hoạt động bề mặt theo các tỷ lệ khác nhau

Ghi chú: Tw80: Tween 80 (Tw80); RLs: Rhamnolipids; DGDG: Digalactosyl Diglyceride

Kết quả (Hình 3.31) cho thấy việc bổ sung chất hoạt động bề mặt đã cải thiện đáng kể hiệu suất phân hủy DDT của các chế phẩm đơn chủng, vốn chỉ đạt khoảng 50% khi không bổ sung. Với *P. anuradhasurensis* PAM67, hiệu quả phân hủy tăng từ ~40% lên đến ~67% sau 2 tuần; trong đó Tween 80 và Rhamnolipids cho kết quả tương tự nhau, đều đạt khoảng 60%. Đặc biệt, khả năng thích ứng tốt của *P. anuradhasurensis* PAM67 với Rhamnolipids – vốn là chất hoạt động bề mặt do nhiều loài *Pseudomonas* tổng hợp [33] giúp chế phẩm này đạt hiệu quả phân hủy cao. Đối với Y042, hiệu suất phân hủy dao động từ 43% đến ~70%, trong đó Tween 80 mang lại tác dụng rõ rệt nhất. Khi bổ sung Tween 80 ở nồng độ 0,1%, chế phẩm Y042 đạt hiệu quả vượt 70% với nồng độ DDT ban đầu 30 ppm.

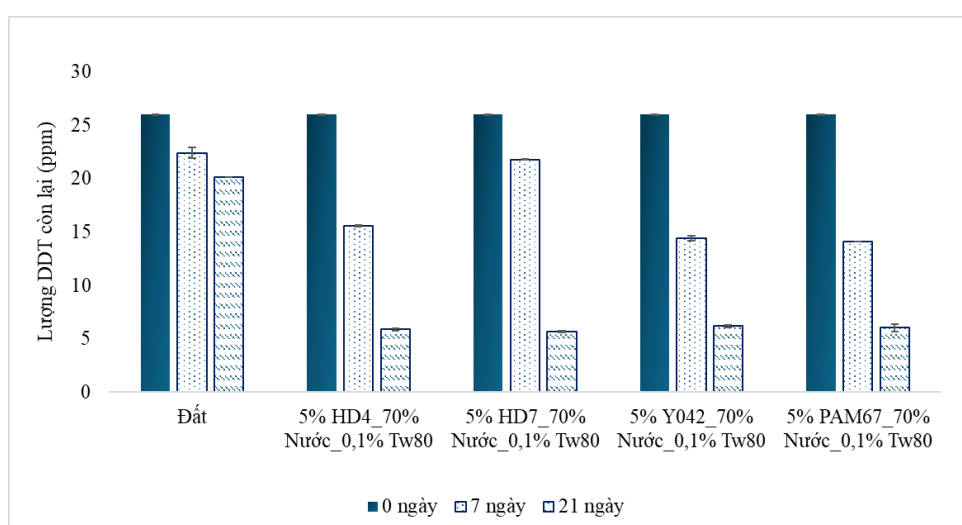
Đối với các chế phẩm tổ hợp, tác động của các chất hoạt động bề mặt cũng tương tự như ở đơn chủng. Trong ba loại chất được khảo sát, Tween 80 cho hiệu quả tăng cường cao nhất, tiếp đến là Rhamnolipids và DGDG. Đáng chú ý, khi bổ sung Tween 80 ở nồng độ 0,1%, hiệu quả phân hủy của HD4 đạt tới 60% và HD7 vượt 50% chỉ sau 14 ngày.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã ghi nhận hiệu quả của việc bổ sung chất hoạt động bề mặt trong quá trình xử lý DDT. Cụ thể, Xiaoxu Wang và cộng sự (2018) cho thấy việc bổ sung 5 mg/kg Rhamnolipids giúp *A. globiformis* phân hủy sinh học được 64,3% DDT sau 150 ngày, cao hơn 60,7% so với nghiệm thức đối chứng [119]. Trong nghiên cứu của Betancur-Corredor và cộng sự (2015), khi bổ sung 6,55 mg/kg (0,000655%) Tween 80, nồng độ DDT (99,46 ppm ban đầu) giảm tới 94,3% sau 8 tuần, trong khi ở đối chứng không bổ sung, mức giảm chỉ đạt 4,28% [24]. Bên cạnh đó, Guo và cộng sự (2014) đã thử nghiệm nhiều loại chất hoạt động bề mặt như TX-100, Tween 80, Brij35 và SDBS để xử lý đất ô nhiễm DDT. Kết quả cho thấy Tween 80 là lựa chọn tối ưu nhờ khả năng hòa tan và rửa giải tốt, giúp giải phóng DDT khỏi đất, đồng thời có mức độ hấp phụ vào đất thấp và ít gây tác động tiêu cực đến hệ sinh thái so với các chất còn lại [54]. Do đó, việc bổ sung Tween 80 giúp tăng cường hiệu quả phân hủy DDT cao hơn Rhamnolipids và DGDG. Như vậy, xét cả về hiệu quả tăng cường và giá thành, phương án bổ sung Tween 80 ở mức 0,1% có lẽ là phù hợp

nhất để áp dụng cho quy trình xử lý DDT của các chế phẩm, cả đơn chủng và tổ hợp chủng.

3.3.1.4 Tổng hợp kết quả và xây dựng quy trình xử lý đất nhiễm DDT

Tổng hợp các kết quả trên, có thể thấy các điều kiện phù hợp để các chế phẩm xử lý DDT hiệu quả nhất là bổ sung chế phẩm ở tỷ lệ 5%, bổ sung nước đạt tỷ lệ 70% và Tween 80 đạt nồng độ 0,1%. Kết quả thử nghiệm ở các điều kiện phù hợp nhất này trong 21 ngày (Hình 3.32) cho thấy chế phẩm HD4 cho hiệu quả xử lý tốt nhất so với các chế phẩm còn lại (làm giảm khoảng 80% DDT trong đất sau 21 ngày).

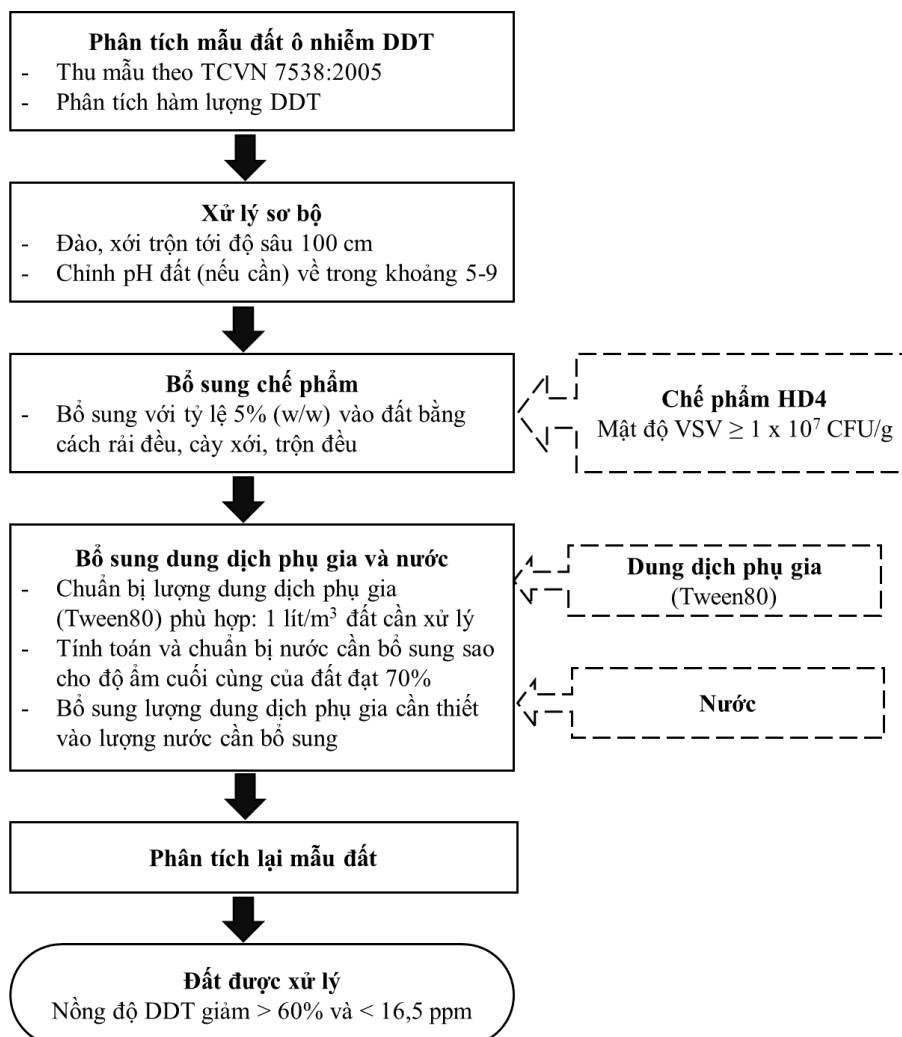


Hình 3.32. So sánh hiệu quả phân giải DDT trong đất của các chế phẩm trong thí nghiệm áp dụng các điều kiện phù hợp nhất (bổ sung 5% chế phẩm + 70% nước + Tween 80 0,1%)

Tóm lại, quy trình xử lý đất ô nhiễm DDT bằng chế phẩm sinh học được thực hiện qua các bước sau. Trước tiên, mẫu đất ô nhiễm được thu thập theo tiêu chuẩn TCVN 7538:2005 và tiến hành phân tích xác định hàm lượng DDT ban đầu. Sau đó, đất được xử lý sơ bộ bằng cách đào, xới trộn đến độ sâu khoảng 100 cm rồi sau đó xác định và điều chỉnh giá trị pH của đất (nếu cần) về khoảng thích hợp từ 5–9. Tiếp theo, chế phẩm sinh học HD4 có mật độ vi sinh vật tối thiểu 1×10^7 CFU/g được bổ sung vào đất với tỷ lệ 5% (w/w). Chế phẩm được rải đều trên bề mặt đất, sau đó tiến hành cày xới và trộn kỹ nhằm đảm bảo sự phân bố đồng đều của vi sinh vật trong

toàn bộ khối đất xử lý. Sau khi bổ sung chế phẩm, dung dịch phụ gia Tween 80 được pha với tỷ lệ 1 lít cho mỗi mét khối đất cần xử lý. Lượng nước bổ sung được tính toán sao cho độ ẩm cuối cùng của đất đạt khoảng 70%. Dung dịch Tween 80 được hòa vào lượng nước cần bổ sung trước khi tưới đều lên đất nhằm tăng khả năng hòa tan và tiếp xúc của DDT với vi sinh vật phân giải. Sau thời gian xử lý, mẫu đất được lấy lại để phân tích hàm lượng DDT còn lại. Quá trình xử lý được đánh giá là đạt yêu cầu khi nồng độ Lindane giảm trên 60% so với ban đầu và hàm lượng DDT còn lại thấp hơn 16,5 ppm.

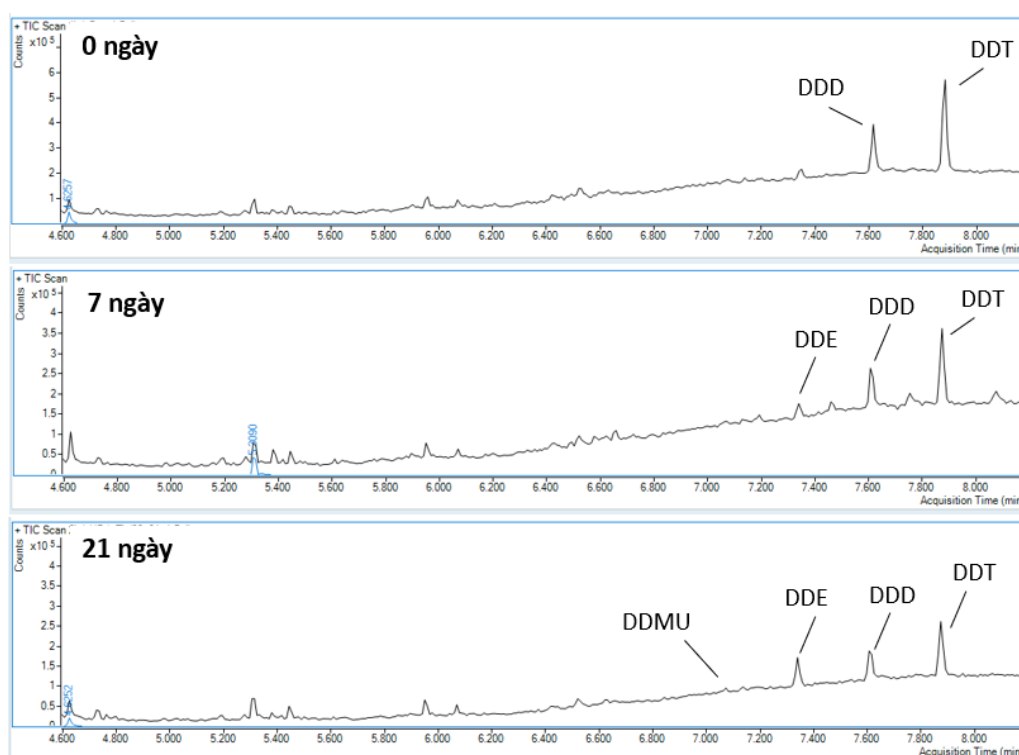
Quy trình này có thể được sơ đồ hóa như sau (Hình 3.33):



Hình 3.33. Sơ đồ quy trình ứng dụng chế phẩm sinh học trong xử lý đất ô nhiễm DDT

3.3.2 Giả thuyết về con đường phân giải DDT bằng chế phẩm sinh học

Kết quả phân tích sắc ký đồ GC-MS cho thấy: Khi sử dụng chế phẩm HD4 thì DDT bị phân hủy thành các chất DDD, DDE và DDMU (Hình 3.34, Phụ lục 27). Ngoài ra, cường độ các đỉnh tương ứng với các chất chuyển hóa trung gian như DDD, DDE và DDMU đều giảm dần theo thời gian, cho thấy các hợp chất này tiếp tục bị chuyển hóa trong quá trình phân hủy. Điều này chứng tỏ không chỉ DDT ban đầu mà cả các sản phẩm phân hủy trung gian cũng được tiếp tục phân giải, làm giảm nguy cơ tồn lưu các chất độc hại thứ cấp trong môi trường.



Hình 3.34. Sắc ký đồ GC-MS thể hiện sản phẩm chuyển hóa của DDT trong đất bởi chế phẩm HD4 theo thời gian

Ghi chú: 1,1,1-dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT); 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE); 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDD); 1-chloro-2,2-bis-(4'-chlorophenyl)ethylene (DDMU).

Dựa trên các chất chuyển hóa này, giả thuyết của chúng tôi về con đường phân hủy DDT trong đất của chế phẩm HD4 được đề xuất như sau (Hình 3.35): Khi bổ

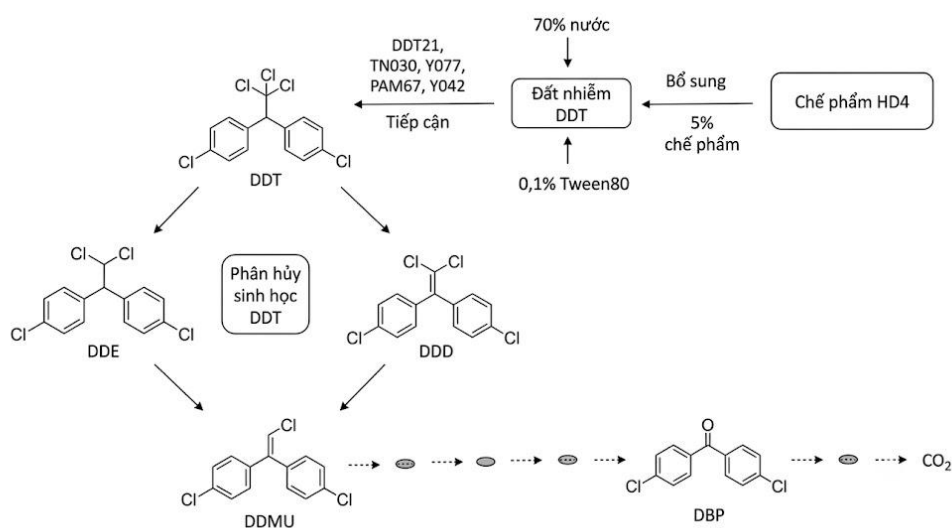
sung Tween 80 vào đất ô nhiễm DDT, chất hoạt động bề mặt này làm tăng khả năng hòa tan sinh học của DDT, giúp các chủng vi sinh vật tiếp cận cơ chất hiệu quả hơn. Trong các vi môi trường kỵ khí của đất, DDT có thể bị khử chloride tạo thành DDD và DDE [126]. Quá trình này có thể được hỗ trợ bởi các enzyme khử halogen như haloalkane dehalogenase, enzyme đã được phát hiện ở hai chủng *C. metallidurans* TN030 và *S. marianii* DDT21. Sự hiện diện của enzyme này cho thấy các chủng vi khuẩn trong chế phẩm có tiềm năng xúc tác quá trình loại bỏ chloride khỏi phân tử DDT. Tiếp theo, DDD và DDE tiếp tục bị loại chloride tạo thành DDMU thông qua các phản ứng khử chloride đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây.

Sau các bước khử chloride, các chất chuyển hóa trung gian có khả năng tiếp tục bị oxy hóa dưới điều kiện hiếu khí nhờ sự phối hợp hoạt động của các chủng trong tổ hợp. Các phản ứng hydroxyl hóa và carboxyl hóa có thể chuyển DDMU thành các hợp chất đơn giản hơn như DBP. Ở các giai đoạn sau, enzyme catechol 1,2-dioxygenase, được mã hóa bởi gen *catA* và được phát hiện ở các chủng *S. marianii* DDT21, *C. metallidurans* TN030, *P. nitroreducens* Y077 và *P. anuradhapurensis* PAM67 (đường (10) – Hình 3.5, Hình 3.2A,B,C, Phụ lục 16), có thể phân hủy phenol và axit benzoic thông qua cơ chế phân cắt ortho của vòng thơm, enzyme này được cho là tham gia vào giai đoạn mở vòng thơm ở các bước sau của quá trình phân giải DDT, sau khi hợp chất đã được khử chloride và hydroxyl hóa [14, 19]. Việc mở vòng thơm được xem là một trong những bước quan trọng nhất trong quá trình khoáng hóa hoàn toàn các hợp chất hữu cơ bền vững, bởi cấu trúc vòng benzen vốn rất khó bị phân hủy trong môi trường tự nhiên. Sau khi vòng thơm bị cắt mở, các chất trung gian có thể dễ dàng đi vào các con đường chuyển hóa trung tâm như chu trình TCA và cuối cùng được khoáng hóa thành CO₂ và H₂O [66].

Sự xuất hiện của các chất chuyển hóa có cấu trúc ngày càng đơn giản theo thời gian cho thấy DDT đã được phân giải từng bước trong đất ô nhiễm DDT. Các sản phẩm chuyển hóa được ghi nhận trong nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả của Pan và cộng sự (2016) [84], qua đó củng cố thêm giả thuyết về con đường phân giải được đề xuất. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về phân giải DDT nhưng hiện nay

vấn việc xác định đặc điểm của toàn bộ con đường trao đổi chất cũng như những gen liên quan đến quá trình trao đổi chất của DDT vẫn chưa được làm sáng tỏ [73].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phần mềm Prokka để dự đoán và chú giải các gen mã hóa protein và enzyme. Mặc dù Prokka là một công cụ nhanh và phổ biến trong chú giải bộ gen vi khuẩn, công cụ này vẫn tồn tại nhược điểm là độ chính xác hạn chế đối với các trình tự mới hoặc hiếm gặp, do phụ thuộc nhiều vào các cơ sở dữ liệu tham chiếu sẵn có. Vì vậy, Prokka có thể bỏ sót các gen chức năng đặc thù trong các bộ gen có nguồn gốc môi trường phức tạp và tạo ra tỷ lệ cao các chú giải dưới dạng protein giả định (hypothetical protein) [44]. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ protein được gán là hypothetical protein vẫn còn khá cao (34,28–50,50%) trong các hệ gen được phân tích. Điều này phản ánh thực tế rằng nhiều trình tự protein trong các chủng được nghiên cứu mặc dù được gán là hypothetical protein không đồng nghĩa với việc không có chức năng mà do cơ sở dữ liệu của phần mềm Prokka còn hạn chế.



Hình 3.35. Giả thuyết về quá trình phân hủy sinh học DDT trong đất bởi chế phẩm HD4

Ghi chú: 1,1,1-dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT); 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE); 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDD); 1-chloro-2,2-bis-(4'-chlorophenyl)ethylene (DDMU); 4,4'-dichlorobenzophenone (DPB)

Một số nghiên cứu đã chỉ ra các chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng hoạt động linh hoạt ở các điều kiện môi trường khác nhau. Chúng hoạt động tốt trong cả 3 môi trường hiếu khí, kỵ khí và kỵ khí tùy tiện [75]. Các loài *Pseudomonas* có khả năng sinh enzyme xúc tác loại bỏ HCl hoặc chloride để tạo thành DDD/DDE [93]. Chủng *Stenotrophomonas* DDT⁻¹ phân lập từ đất bị ô nhiễm đã được báo cáo là có khả năng sử dụng DDT như nguồn năng lượng và cacbon duy nhất, các sản phẩm phân giải được tạo ra gồm DDE, DDD, DDOH, DDMU và DDA [84]. Một nghiên cứu về một chủng khác là *Stenotrophomonas* sp. DXZ9 đã cho thấy chủng này không chỉ làm giảm hàm lượng DDE mà còn làm giảm hàm lượng DDT. Cụ thể, hiệu quả phân hủy sinh học của chủng đối với DDE đạt 39,4% sau 5 ngày và 41,9% sau 10 ngày, còn đối với DDT đạt tương ứng là 55% và 57,6% [125]. Chủng *Ralstonia eutropha* A5 có khả năng phân giải tốt DDD trong điều kiện hiếu khí [57]. Ngoài ra, hầu hết các xạ khuẩn phân hủy DDT theo các con đường hiếu khí, công bố cụ thể về các chủng *Streptomyces* 885 có khả năng phân hủy 55,9% DDD sau 28 ngày thành DDOH và DBP [60]. Đặc biệt, enzyme catechol 1,2-dioxygenase giúp phân giải DDT được tìm thấy ở một số chủng *Streptomyces* [14] hay *Pseudomonas* [107].

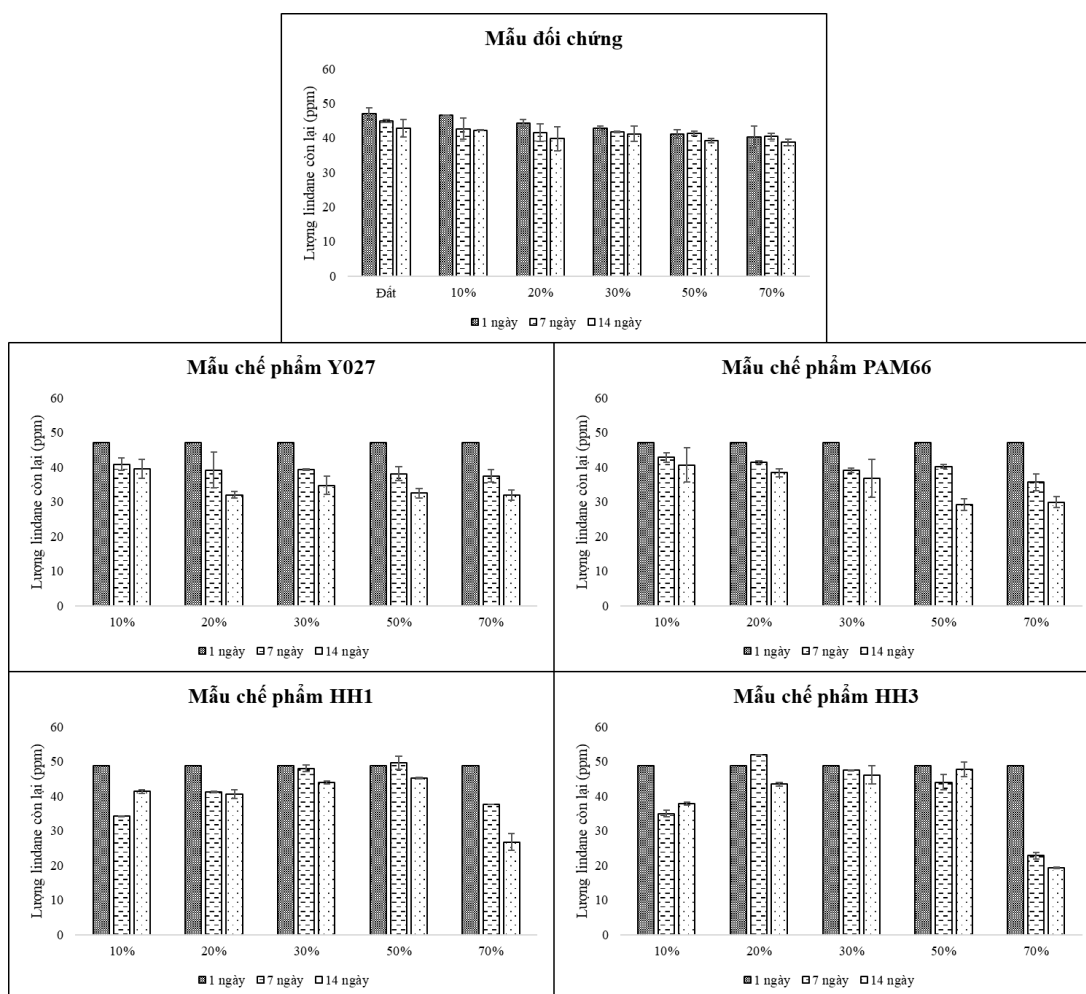
3.3.3 Thử nghiệm xử lý ô nhiễm đất Lindane ở quy mô phòng thí nghiệm

Trên cơ sở tổng hợp các kết quả nêu trên về khả năng sống sót, duy trì hoạt tính phân giải Lindane của các chủng trong quá trình sản xuất, chúng tôi lựa chọn hai chế phẩm sinh học đơn chủng tốt nhất (*Pseudomonas putida* PAM66 và *Sphingobacterium mizutaii* Y027) làm đối chứng để khảo nghiệm tiếp cùng với các chế phẩm tổ hợp chủng tốt nhất (HH1 và HH3).

3.3.3.1 Khảo sát tỷ lệ nước khác nhau

Khả năng xử lý đất ô nhiễm Lindane bằng các chế phẩm đơn chủng (*Pseudomonas putida* PAM66 và *Sphingobacterium mizutaii* Y027) và các chế phẩm tổ hợp chủng (HH1 và HH3) với các tỷ lệ bổ sung nước khác nhau (10, 20, 30, 50, 70%) được đánh giá. Kết quả (Hình 3.36) cho thấy với các tỉ lệ bổ sung nước tăng dần, hiệu quả phân hủy Lindane cũng tăng theo tỷ lệ thuận. Khác với thí nghiệm với

DDT, trong thí nghiệm này hiệu quả phân giải của các chế phẩm đơn chủng đường như đã đạt cao nhất với tỷ lệ bổ sung nước chỉ là 50%: cả hai chế phẩm *Pseudomonas putida* PAM66 và *Sphingobacterium mizutaii* Y027 đều làm giảm ~30% Lindane sau 2 tuần, tương tự như với tỷ lệ 70%. Tuy nhiên, trong trường hợp các chế phẩm tổ hợp, hiệu quả phân giải của các tổ hợp chỉ tăng rõ rệt với tỷ lệ bổ sung nước 70%: chế phẩm HH1 làm giảm ~50% Lindane, chế phẩm HH3 làm giảm ~70% Lindane sau 2 tuần.



Hình 3.36. Khả năng xử lý Lindane trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm nước theo các tỷ lệ khác nhau

Như vậy, giả thiết được đặt ra về ảnh hưởng của tỉ lệ nước với quá trình phân hủy Lindane là tương tự như với quá trình phân hủy DDT: tỉ lệ bổ sung nước cao tạo

điều kiện kỵ khí, từ đó các chủng vi khuẩn phân giải Lindane tốt hơn theo con đường loại chloride. Tuy nhiên, lượng nước đòi hỏi cho hai chủng chọn lọc phân giải Lindane không phải là quá nhiều. Kết quả nghiên cứu khá tương đồng với kết quả của Juliana M. Saez và cộng sự (2014), cho thấy việc bổ sung hơn 60% nước vào đất tạo môi trường phân hủy Lindane thuận lợi cho *Streptomyces* [97].

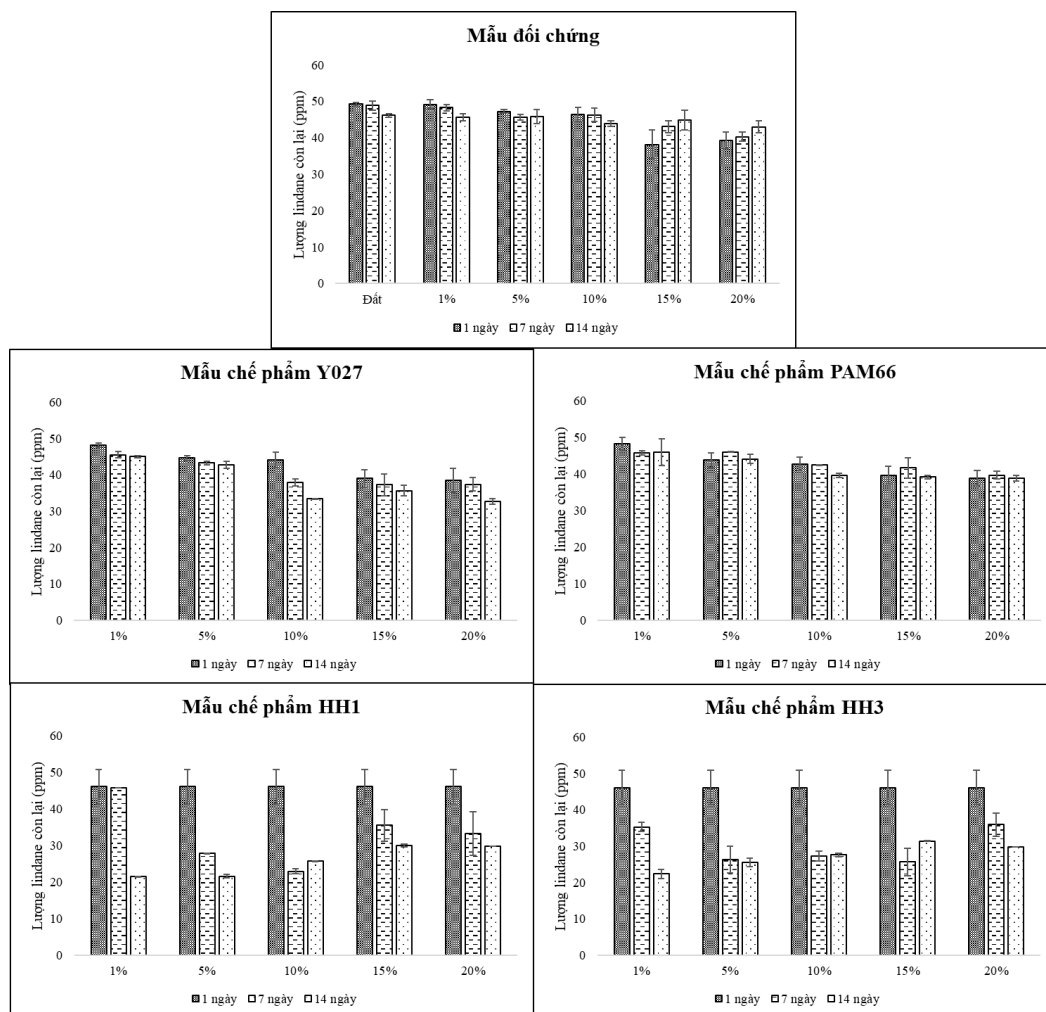
Kết quả trên cũng cho thấy, đối với quá trình phân giải Lindane, ảnh hưởng của độ ẩm lên các chế phẩm dạng đơn chủng và dạng tổ hợp là không hoàn toàn như nhau. Tuy nhiên, xu thế hiệu quả phân giải tăng khi tỷ lệ nước tăng gợi ý vai trò quan trọng của chuyển hóa kỵ khí. Có thể với các đơn chủng *Pseudomonas putida* PAM66 và *Sphingobacterium mizutaii* Y027, năng lực phân giải Lindane trong điều kiện kỵ khí của chúng chỉ đạt tới giới hạn nhất định nên hiệu quả phân giải không tăng hơn khi tỷ lệ nước tăng tới 70%. Như vậy, tương tự với DDT, có lẽ con đường hiệu quả nhất để xử lý Lindane là dựa trên phân giải kỵ khí là chính. Theo Camacho-Pérez và cộng sự (2012), con đường phân hủy Lindane được biết phổ biến nhất là thông qua loại chloride trước (kỵ khí) và ôxi hóa sau (hiếu khí) để mở vòng [32]. Do đó, kết quả thu được là có thể lý giải được và cho thấy, cần tạo điều kiện kỵ khí để các tổ hợp chủng phân giải Lindane hiệu quả hơn. Với các kết quả trên, chúng tôi nhận định tỷ lệ bổ sung nước 70% là phù hợp hơn cả với các chế phẩm và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.3.2 Khảo sát tỷ lệ chế phẩm khác nhau

Khả năng xử lý đất ô nhiễm Lindane (50 ppm) bằng các chế phẩm đơn chủng tốt nhất (*Pseudomonas putida* PAM66 và *Sphingobacterium mizutaii* Y027) và các chế phẩm dạng tổ hợp chủng tốt nhất (HH1 và HH3) với các tỷ lệ bổ sung chế phẩm khác nhau (1%, 5%, 10%, 15%, 20%) được đánh giá, trong điều kiện bổ sung nước đến tỷ lệ tối ưu là 70%.

Kết quả thí nghiệm (Hình 3.37) cho thấy sau 14 ngày, các chế phẩm đơn chủng Y027 và PAM66 (tỷ lệ bổ sung 10%) phân giải được khoảng 20% và 7% Lindane từ nồng độ ban đầu 50 ppm. Khi tăng tỷ lệ chế phẩm lên 15% và 20%, hiệu quả xử lý

không cải thiện đáng kể, cho thấy mức 10% là phù hợp nhất đối với các đơn chủng. Ngược lại, ở các tỷ lệ thấp hơn 10%, sự giảm Lindane diễn ra chậm, và đặc biệt ở mức 1% thì nồng độ gần như không thay đổi sau 28 ngày. Tuy nhiên, có thể thấy đối với việc bổ sung các chế phẩm dạng tổ hợp chủng, khả năng giảm Lindane mạnh hơn so với khi bổ sung đơn chủng. Đặc biệt, chỉ cần bổ sung tỷ lệ rất nhỏ 1% đã cho thấy hiệu quả vượt trội (giảm còn ~23%) sau 14 ngày.



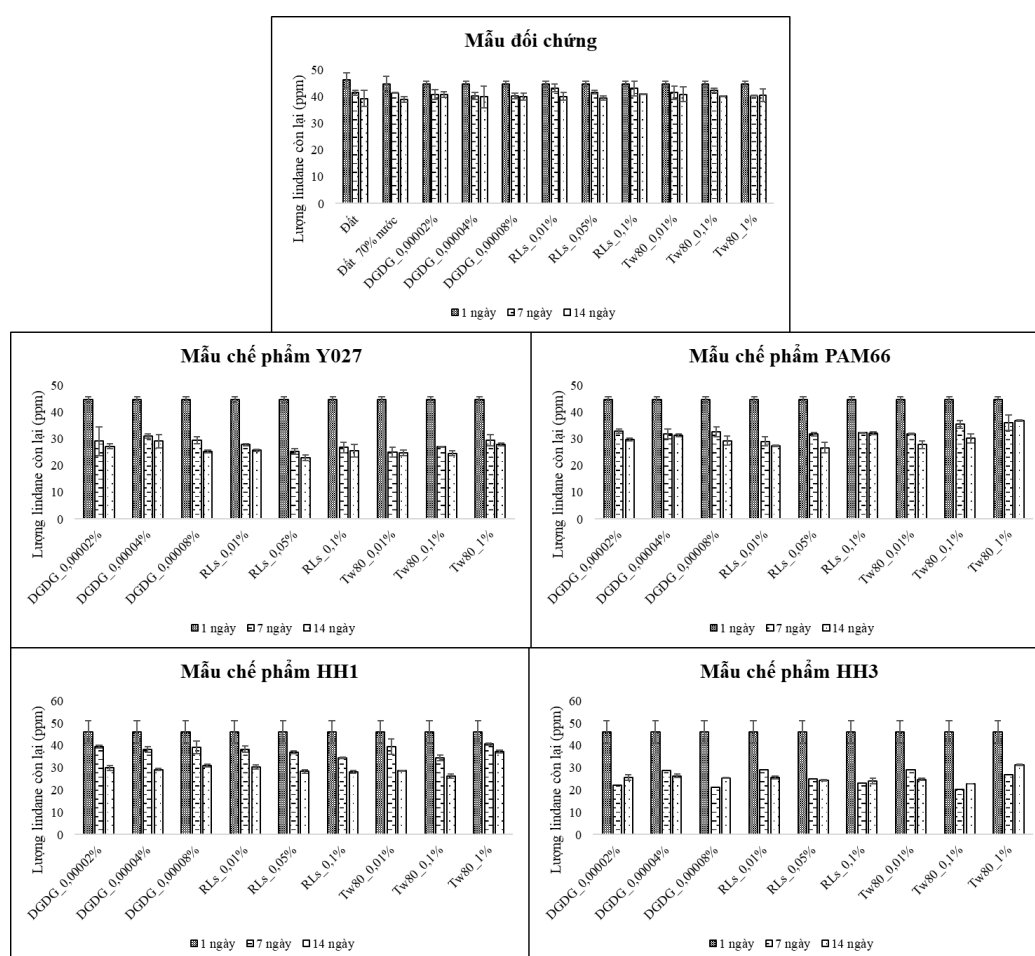
Hình 3.37. Khả năng xử lý Lindane trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung tỷ lệ chế phẩm theo các tỷ lệ khác nhau

Tổng hợp các kết quả và cân nhắc thêm khía cạnh kinh tế, chúng tôi nhận định, để xử lý Lindane, nếu sử dụng chế phẩm đơn chủng thì nên chọn tỷ lệ bổ sung chế

phẩm khoảng 10%, còn nếu sử dụng chế phẩm tổ hợp thì có thể chỉ cần bổ sung theo tỷ lệ 1% chế phẩm.

3.3.3.3 Khảo sát các chất hoạt động bề mặt khác nhau

Ba loại chất hoạt động bề mặt được lựa chọn khảo sát gồm: Digalactosyl Diglyceride (0,00002%; 0,00004%; 0,00008%); Rhamnolipids (0,01%; 0,1%; 1%); và Tween 80 (0,01%; 0,1%; 1%). Các chế phẩm được đánh giá khả năng xử lý Lindane khi bổ sung các chất hoạt động bề mặt theo các phương án khác nhau nêu trên, dưới điều kiện tỷ lệ nước 70% và tỷ lệ bổ sung chế phẩm là 10%.



Hình 3.38. Khả năng xử lý Lindane trong đất bằng các chế phẩm đơn chủng và tổ hợp chủng trong thí nghiệm bổ sung chất hoạt động bề mặt theo các tỷ lệ khác nhau

Ghi chú: Tw80: Tween 80 (Tw80); RLs: Rhamnolipids; DGDG: Digalactosyl Diglyceride

Sau 14 ngày, các chế phẩm đơn chủng có bổ sung chất hoạt động bề mặt có hiệu quả phân hủy Lindane đạt từ khoảng 30–40% (Hình 3.38), cao hơn đáng kể so với khi chỉ bổ sung nước. Trong đó, *Pseudomonas putida* PAM66 có hiệu quả xử lý đạt gần 40%, còn *Sphingobacterium mizutaii* Y027 thể hiện hiệu quả nổi trội hơn, dao động từ 40–50%. Đặc biệt, khi bổ sung Tween 80, chế phẩm *Sphingobacterium mizutaii* Y027 cho kết quả tốt nhất với hiệu quả phân hủy 48% từ nồng độ ban đầu 50 ppm. So sánh giữa các chất hoạt động bề mặt, Tween 80 nhìn chung mang lại hiệu quả cao hơn hoặc tương đương so với Rhamnolipids và DGDG.

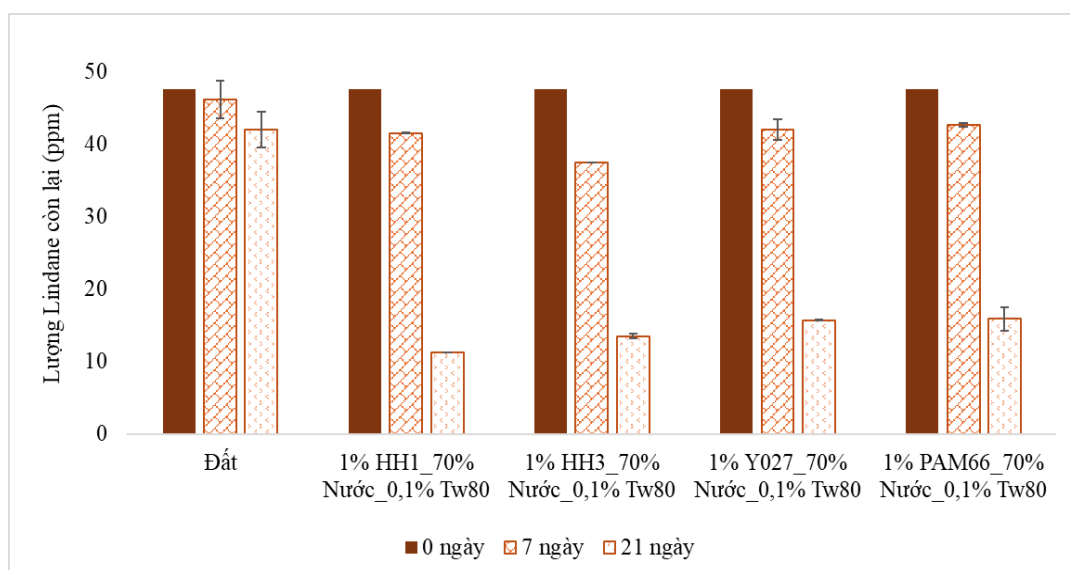
Đối với chế phẩm tổ hợp, tác động của các chất hoạt động bề mặt cũng tương tự như với đơn chủng, trong đó Tween 80 tiếp tục thể hiện vai trò tăng cường tốt nhất, kể đến là Rhamnolipids và DGDG. Tuy nhiên, so với kết quả trên DDT, sự khác biệt về tác dụng giữa các loại chất hoạt động bề mặt trong xử lý Lindane không quá rõ rệt. Đáng chú ý, khi bổ sung Tween 80 ở nồng độ 0,1%, hiệu quả xử lý của các tổ hợp HH1 và HH3 đạt khoảng 50% chỉ sau 14 ngày.

Các kết quả trên phù hợp với nghiên cứu của Saez và cộng sự (2015), trong đó việc bổ sung 1–1,25 mM Tween 80 giúp tăng khả năng hòa tan Lindane trong dung dịch (50–100 mg/L), tạo điều kiện cho vi sinh vật tiếp cận và phân giải Lindane hiệu quả, đạt tới 97% [99]. Những phát hiện này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Tuy nhiên, tiềm năng ứng dụng Tween 80 trong cải thiện quá trình xử lý Lindane ngay tại môi trường đất ô nhiễm vẫn chưa được khai thác triệt để. Do đó, tương tự như đối với DDT, xét về cả chi phí và hiệu quả, bổ sung Tween 80 ở nồng độ 0,1% được xem là phương án khả thi nhất cho quá trình xử lý Lindane bằng các chế phẩm. Trong trường hợp cần ưu tiên yếu tố kinh tế, kết quả cũng gợi ý rằng tỷ lệ Tween 80 ở mức 0,01% vẫn có thể cân nhắc áp dụng.

3.3.3.4 Tổng hợp kết quả và xây dựng quy trình xử lý đất nhiễm Lindane

Tổng hợp các kết quả trên, có thể thấy các điều kiện phù hợp để các chế phẩm xử lý DDT hiệu quả nhất là bổ sung chế phẩm ở tỷ lệ 1%, bổ sung nước đạt tỷ lệ 70% và Tween 80 đạt nồng độ 0,1%. Kết quả thử nghiệm ở các điều kiện phù hợp nhất

này trong 21 ngày (Hình 3.39) cho thấy chế phẩm HH1 cho hiệu quả xử lý tốt nhất so với các chế phẩm còn lại (làm giảm khoảng 75% Lindane trong đất sau 21 ngày).

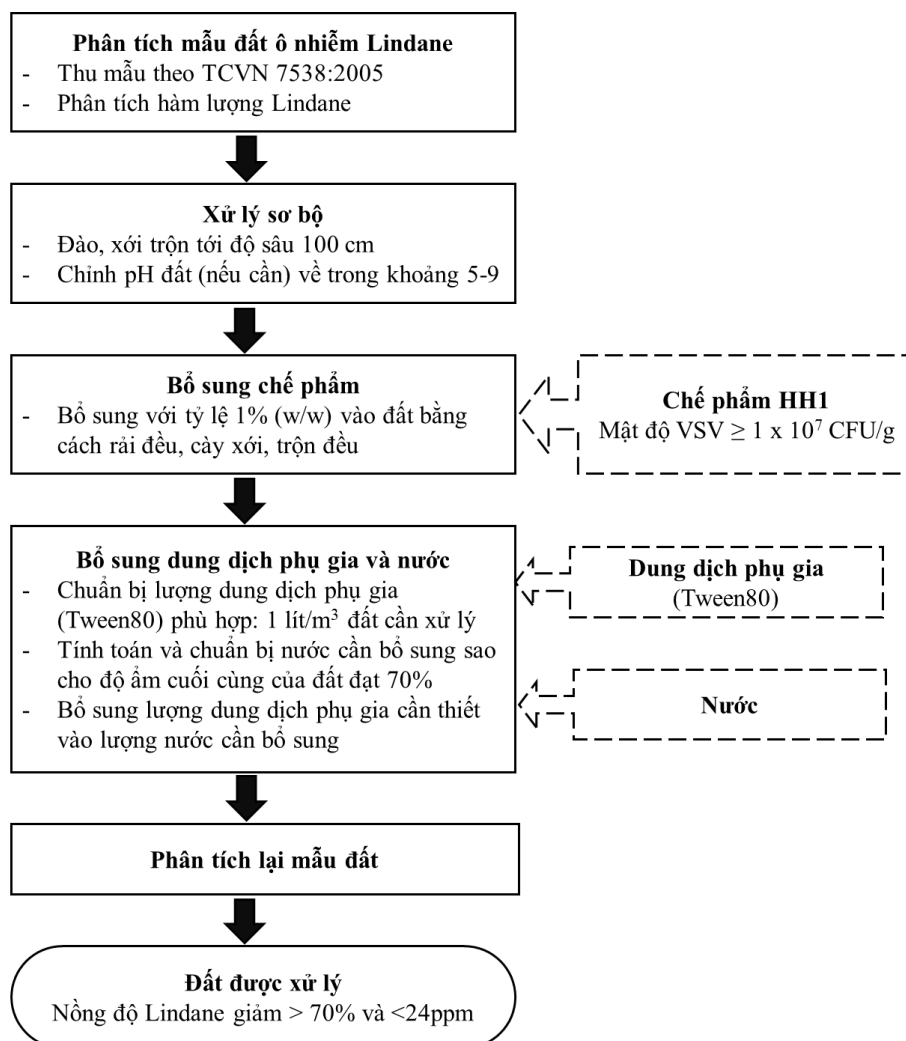


Hình 3.39. So sánh hiệu quả phân giải Lindane trong đất của các chế phẩm trong thí nghiệm áp dụng các điều kiện phù hợp nhất (bổ sung 1% chế phẩm + 70% nước + Tween 80 0,1%)

Tóm lại, quy trình xử lý đất ô nhiễm Lindane bằng chế phẩm sinh học được thực hiện qua các bước sau. Trước tiên, mẫu đất ô nhiễm được thu thập theo tiêu chuẩn TCVN 7538:2005 và tiến hành phân tích xác định hàm lượng Lindane ban đầu. Sau đó, đất được xử lý sơ bộ bằng cách đào và xới trộn đến độ sâu khoảng 100 cm nhằm tăng độ đồng nhất của mẫu đất. Giá trị pH của đất được kiểm tra và điều chỉnh (nếu cần) về khoảng thích hợp từ 5–9 để tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động của vi sinh vật. Tiếp theo, chế phẩm sinh học HH1 có mật độ vi sinh vật tối thiểu 1×10^7 CFU/g được bổ sung vào đất với tỷ lệ 1% (w/w). Chế phẩm được rải đều trên bề mặt đất, sau đó tiến hành cày xới và trộn kỹ nhằm đảm bảo sự phân bố đồng đều của vi sinh vật trong toàn bộ khối đất xử lý. Sau khi bổ sung chế phẩm, dung dịch phụ gia Tween 80 được pha với tỷ lệ 1 lít cho mỗi mét khối đất cần xử lý. Lượng nước bổ sung được tính toán sao cho độ ẩm cuối cùng của đất đạt khoảng 70%. Dung dịch Tween 80 được hòa vào lượng nước cần bổ sung trước khi tưới đều lên đất nhằm tăng

khả năng hòa tan và tiếp xúc của Lindane với vi sinh vật phân giải. Sau thời gian xử lý, mẫu đất được lấy lại để phân tích hàm lượng Lindane còn lại. Quá trình xử lý được đánh giá là đạt yêu cầu khi nồng độ Lindane giảm trên 70% so với ban đầu và hàm lượng Lindane còn lại thấp hơn 24 ppm. Khi đáp ứng đồng thời hai tiêu chí này, đất được xem là đã được xử lý thành công bằng chế phẩm sinh học.

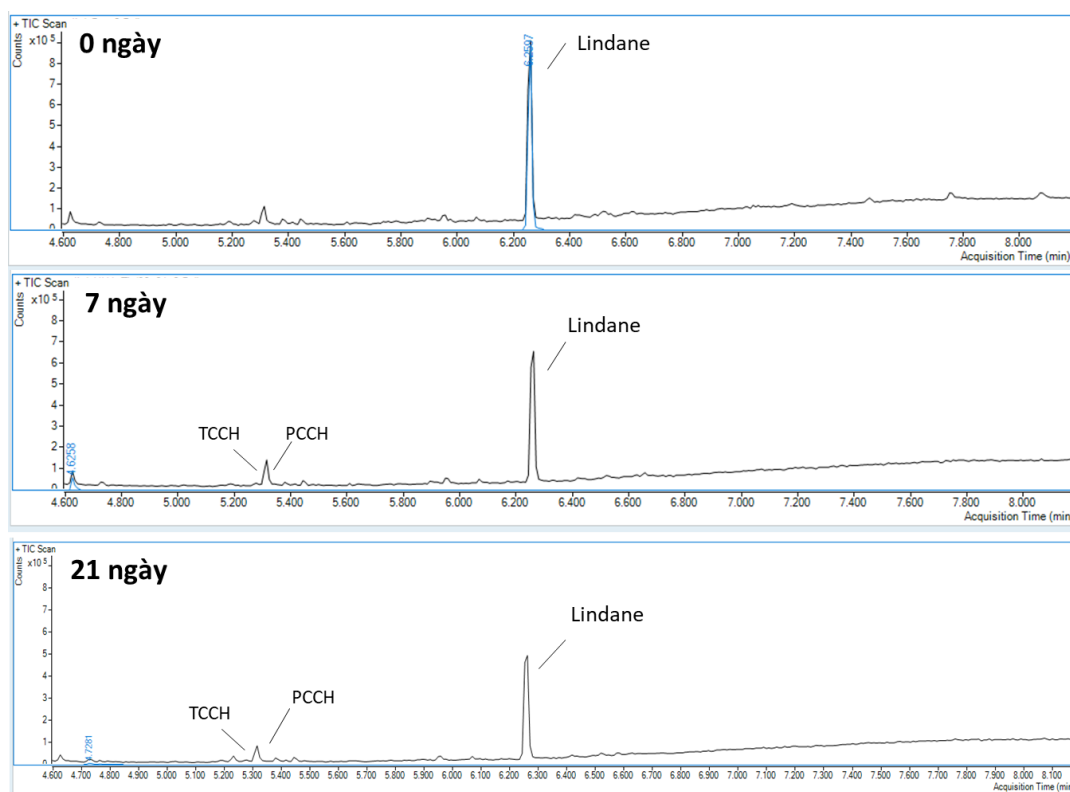
Quy trình này có thể được sơ đồ hóa như sau (Hình 3.40):



Hình 3.40. Sơ đồ quy trình ứng dụng chế phẩm sinh học trong xử lý đất ô nhiễm Lindane

3.3.4 Giả thuyết về con đường phân giải Lindane bằng chế phẩm sinh học

Kết quả phân tích sắc ký đồ GC-MS cho thấy: Khi sử dụng chế phẩm HH1 thì Lindane bị phân hủy thành các chất như PCCH và TCCH (Hình 3.41, Phụ lục 28). Đây là những sản phẩm đặc trưng của quá trình khử chloride trong con đường phân giải kị khí đã được ghi nhận trước đây [132].

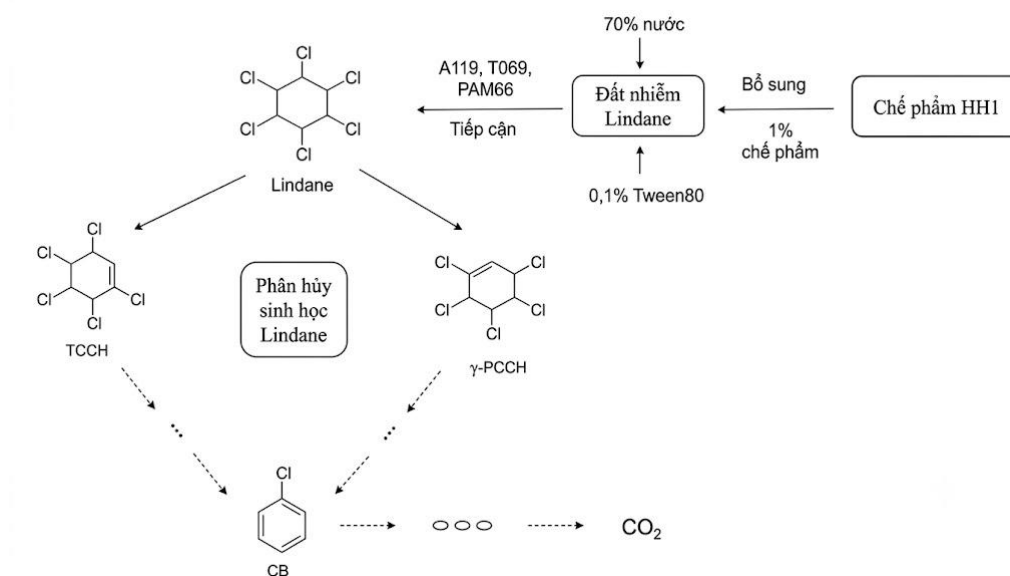


Hình 3.41. Sắc ký đồ GC-MS thể hiện sản phẩm chuyển hóa của Lindane trong đất bởi chế phẩm HH1 theo thời gian

Ghi chú: pentachlorocyclohexane (PCCH), tetrachlorocyclohexene (TCCH)

Ngoài ra, ta có thể thấy sau 7 ngày xử lý cường độ đỉnh của Lindane giảm rõ rệt so với thời điểm ban đầu, đồng thời xuất hiện thêm các đỉnh mới tương ứng với các sản phẩm chuyển hóa trung gian là TCCH và PCCH. Điều này cho thấy Lindane đã bắt đầu bị phân hủy và chuyển hóa thành các hợp chất trung gian thông qua quá trình khử chloride. Đến ngày thứ 21, cường độ đỉnh của Lindane tiếp tục giảm mạnh, đồng thời các đỉnh của TCCH và PCCH cũng giảm đáng kể so với thời điểm 7 ngày.

Kết quả này chứng tỏ các chất trung gian không tích lũy trong hệ thống mà tiếp tục được chuyển hóa trong quá trình xử lý. Kết quả này cho thấy quy trình xử lý bằng chế phẩm HH1 không chỉ làm giảm hàm lượng ban đầu của Lindane mà còn tiếp tục chuyển hóa các sản phẩm trung gian, góp phần hạn chế nguy cơ tồn lưu các hợp chất độc hại thứ cấp trong môi trường.



Hình 3.42. Giả thuyết về quá trình phân hủy sinh học Lindane trong đất bởi chế phẩm HH1

Ghi chú: pentachlorocyclohexane (PCCH), tetrachlorocyclohexene (TCCH), chlorobenzene (CB)

Dựa trên các chất chuyển hóa này, giả thuyết của chúng tôi về con đường phân hủy Lindane trong đất của chế phẩm HH1 được đề xuất như sau (Hình 3.42): Khi bổ sung 0,1% Tween 80 vào đất chứa Lindane, Tween 80 giúp các chủng vi khuẩn tiếp xúc dễ dàng hơn với Lindane. Các chủng vi khuẩn sẽ chuyển hóa Lindane thành các chất có cấu trúc đơn giản hơn là pentachlorocyclohexane (PCCH) và tetrachlorocyclohexene (TCCH) bằng cách loại chloride, chủ yếu trong điều kiện kỵ khí. Đây là những sản phẩm trung gian của sự phân giải Lindane [39, 98, 132]. Hai chất PCCH và TCCH sinh ra có thể được tiếp tục loại chloride theo con đường kỵ khí, nhiều khả năng đến sản phẩm tế bào dễ sử dụng là chlorobenzene (CB) [132], rồi sau

đó chất này được mở vòng và phân hủy hoàn toàn nhờ các con đường trao đổi chất trung tâm. Các bước sau có thể liên quan đến cả các con đường hiếu khí nên việc sử dụng tổ hợp chủng có lẽ rất quan trọng, cho phép các chủng thành phần hỗ trợ lẫn nhau về các con đường phân giải hiếu khí và kỵ khí. Kết quả này cũng tương tự kết quả của Quintero và cộng sự (2006) về sự phân hủy kỵ khí của Lindane thấy rằng nhiều sản phẩm trung gian là PCCH, TCCH, 1,2,3-TCB, 1,3-DCB và CB. Nồng độ của các chất này rất thấp và không bị tích lũy theo thời gian, theo thời gian cũng phân hủy thành CB như sản phẩm cuối cùng trong quá trình phân hủy này [92]. Cuối cùng, các sản phẩm trung gian này tiếp tục bị chuyển hóa triệt để trong quá trình phân hủy.

Trong con đường phân giải Lindane điển hình ở *Sphingomonas paucimobilis* UT26, enzyme LinB – một haloalkane dehalogenase – đảm nhận bước thứ hai trong chuỗi phản ứng chuyển hóa Lindane thành các chất trung gian ít chloride hơn [81]. Poonam Sharma và cộng sự (2006) báo cáo rằng enzyme haloalkane dehalogenase tham gia trực tiếp vào quá trình chuyển hóa beta- và delta-HCH (Lindane) thành PCCH và một số thành TCCH [102]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng phát hiện thấy haloalkane dehalogenase ở chủng *Streptomyces katrae* A119, được mã hóa bởi gen *dhaA*, mặc dù các nghiên cứu trước đây thường công bố enzyme này được mã hóa bởi gen *linB* [32, 98]. Kết quả này cho thấy các dehalogenase khác (không phải enzyme phổ biến được mã hóa bởi *linB*) của các chủng nghiên cứu có thể tham gia vào quá trình phân giải Lindane. Như vậy, các chủng trong nghiên cứu này có tiềm năng bổ sung cho nhóm mang gen *lin* điển hình, qua đó giúp mở rộng tiềm năng ứng dụng vi sinh vật trong phân giải Lindane.

Ngoài ra, như đã phân tích ở trên, do phụ thuộc nhiều vào cơ sở dữ liệu tham chiếu, Prokka có thể chưa nhận diện đầy đủ các gen chức năng đặc thù trong các bộ gen có nguồn gốc từ môi trường phức tạp, dẫn đến tỷ lệ cao các trình tự chỉ được chú giải ở mức protein giả định.

Khả năng thích nghi đa dạng và linh hoạt của các vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* trong các điều kiện môi trường giúp chúng có khả năng hoạt động và

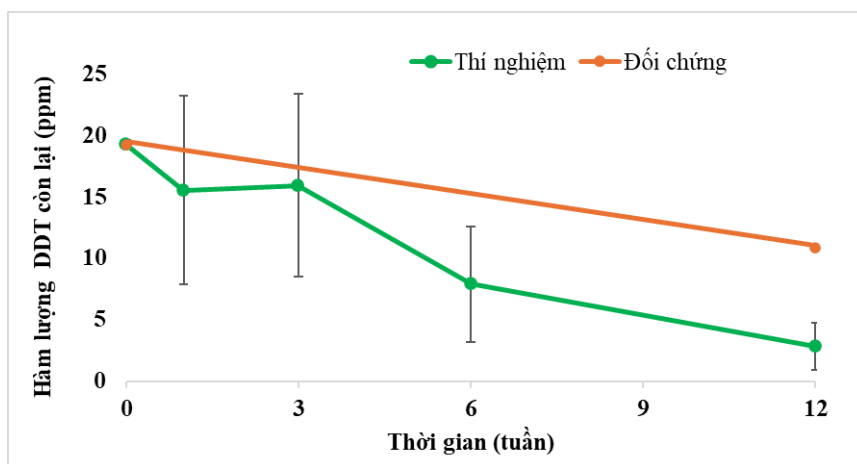
sử dụng nguồn cacbon cả trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí [75]. Đã có những kết quả nghiên cứu cho thấy γ -HCH có thể được phân hủy bởi chủng *Pseudomonas nitroreducens* J5-1 thành γ -PCCH, 1,2,4-TCB và 3,4,6-trichlorocatechol [130]. Trong một số nghiên cứu khác, các xạ khuẩn cũng có thể phân hủy Lindane theo cơ chế linh hoạt tương tự. Ví dụ, theo Sineli (2016), chủng *Streptomyces* sp. M7 phân giải Lindane sau 7 ngày thành các đồng phân pentachlorocyclohexenes, tetrachlorocyclohexenes, chlorobenzenes và chlorophenols [105].

3.3.5 Bước đầu thử nghiệm đất nhiễm DDT/Lindane trên mô hình thực tế

Sau khi đã xây dựng được quy trình xử lý đất ô nhiễm DDT bằng chế phẩm HD4 và đất ô nhiễm Lindane bằng chế phẩm HH1 ở quy mô phòng thí nghiệm, chúng tôi tiến hành bước đầu thử nghiệm các chế phẩm và quy trình xử lý này trên mô hình thực tế (Phụ lục 29 và Phụ lục 30). Đây là bước cần thiết để sơ bộ đánh giá hiệu quả xử lý thực sự khi các sản phẩm và quy trình nói trên được ứng dụng ngoài thực địa.

3.3.5.1 Bước đầu thử nghiệm xử lý đất ô nhiễm DDT trên mô hình thực tế

Kết quả theo dõi hàm lượng DDT còn lại trong đất được thể hiện ở Hình 3.43 cho thấy xu hướng giảm rõ rệt theo thời gian, đặc biệt ở lô thí nghiệm. Cụ thể, nồng độ DDT ban đầu là 19,25 ppm, sau 6 tuần giảm mạnh còn khoảng 7,9 ppm và tiếp tục giảm xuống chỉ còn khoảng 2,83 ppm ở tuần thứ 12 (hiệu suất phân giải đạt ~ 85%). Trong khi đó, lô đối chứng chỉ giảm nhẹ xuống 10,89 ppm sau 12 tuần.

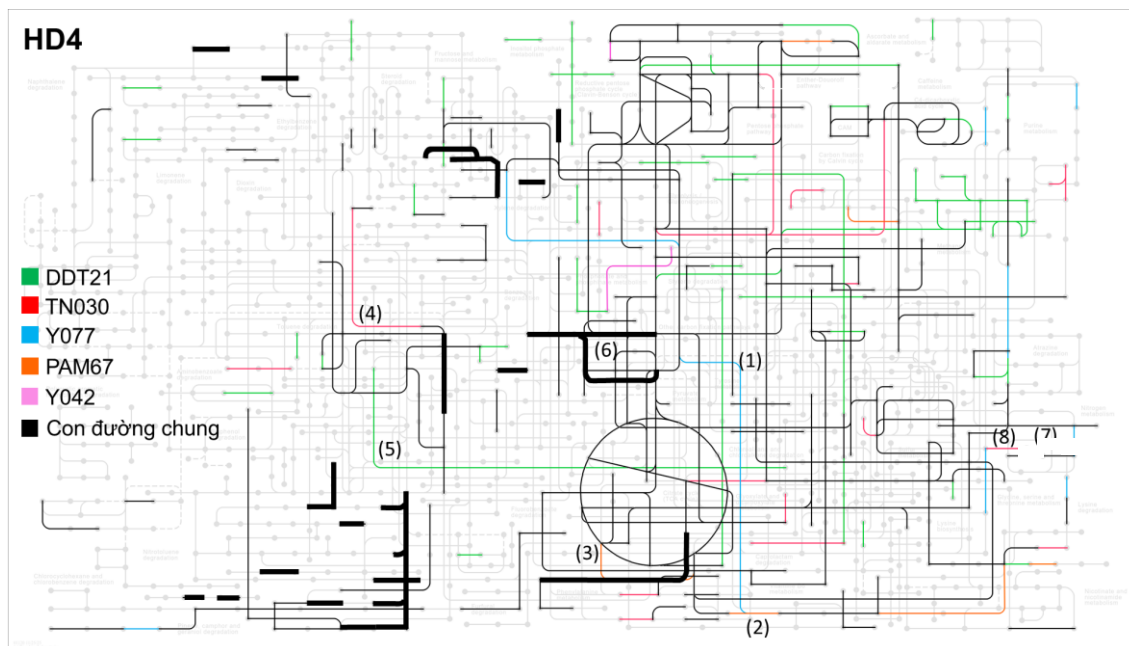


Hình 3.43. Hàm lượng DDT còn lại trong đất theo thời gian

Sự khác biệt trên về sự thay đổi nồng độ DDT trong đất giữa trường hợp thí nghiệm và trường hợp đối chứng khẳng định việc bổ sung chế phẩm HD4 đã thúc đẩy quá trình phân giải DDT trong đất, mang lại hiệu quả xử lý cao hơn đáng kể so với phân giải trong điều kiện tự nhiên.

So với mô hình trong phòng thí nghiệm, sau 3 tuần đầu trong điều kiện thực địa, hiệu suất phân giải DDT chỉ đạt khoảng 5% cho thấy vi sinh vật cần thời gian thích nghi với điều kiện đất ô nhiễm trước khi phát huy hiệu quả xử lý. Sự khác biệt này có thể do điều kiện thực nghiệm được kiểm soát ổn định hơn, trong khi ngoài thực địa chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như tính chất đất, sự cạnh tranh của hệ vi sinh vật bản địa,... Tuy nhiên, chế phẩm HD4 đạt hiệu suất phân giải DDT khoảng 80% sau 21 ngày, trong khi ở mô hình thực tế sau 12 tuần hiệu suất đạt khoảng 85%. Điều này cho thấy chế phẩm HD4 có khả năng thích nghi và ứng dụng tốt trong điều kiện thực địa, đồng thời chứng minh tiềm năng xử lý ô nhiễm DDT trên quy mô thực tế. Cũng lưu ý rằng phân giải tự nhiên trong thời gian này có lẽ tốt hơn một phần là do trong thời gian thử nghiệm có khá nhiều trận mưa tại địa điểm thử nghiệm (Nghĩa Đàn, Nghệ An).

Tổ hợp HD4 gồm các chủng *Streptomyces marianii* DDT21, *Cupriavidus metallidurans* TN030, *Pseudomonas nitroreducens* Y077, *Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67 và *Stenotrophomonas maltophilia* Y042, trong đó có 2 chủng trung tâm là *Streptomyces marianii* DDT21 và *Cupriavidus metallidurans* TN030. Như đã phân tích ở trên, hai chủng này đóng vai trò chính, có đa dạng các con đường về phân giải chlorocyclohexane, chlorobenzene và phân giải dioxin nhất. Trong khi đó, các chủng còn lại có vai trò hỗ trợ tăng tiềm năng trao đổi chất và tăng khả năng thích nghi của hỗn hợp với các điều kiện môi trường khác nhau. Có thể thấy, sự kết hợp của các chủng làm hoàn thiện hơn các con đường trao đổi chất, giúp cho quá trình phân giải có thể diễn ra triệt để và nhanh hơn. Ngoài ra, khi ở ngoài môi trường với những điều kiện nhiều biến đổi thì sự đa dạng trong các con đường trao đổi chất sẽ giúp cho tổ hợp thích nghi tốt hơn. Nhiều nghiên cứu đều cho thấy sự phân giải DDT bởi tổ hợp chủng hiệu quả hơn so với bởi đơn chủng [91, 116].



Hình 3.44. Bản đồ chuyển hóa các chủng của tổ hợp HD4

Ghi chú: (1) glutaryl-CoA transferase; (2) glutarate dioxygenase; (3) glutarate dioxygenase; (4) 2-aminobenzoate-CoA ligase; (5) 3-hydroxybenzoate 6-monooxygenase; (6) 4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase

Khi phân tích bản đồ chuyển hóa các chủng của tổ hợp HD4 (Hình 3.44) có thể thấy, chủng *Pseudomonas nitroreducens* Y077 có enzyme glutaryl-CoA transferase (đường màu xanh da trời (1), Hình 3.44) là enzyme quan trọng giúp chuyển glutarate thành glutaryl-CoA; trong khi đó chủng *Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67 có enzyme glutarate dioxygenase (đường màu cam (2), Hình 3.44) giúp oxy hóa glutarate thành L-2-hydroxyglutarate. Glutarate là một sản phẩm của quá trình phân hủy các hợp chất có vòng thơm sau khi vòng thơm bị mở. Do đó, sự hiện diện đồng thời của các enzyme này cho phép các sản phẩm trung gian của quá trình phân hủy hợp chất vòng thơm được tiếp tục chuyển hóa thành các chất trung gian của chuyển hóa trung tâm, qua đó giúp quá trình phân hủy diễn ra triệt để và hiệu quả hơn. Ngoài ra, glutarate dioxygenase (đường màu cam (3), Hình 3.44) cũng xuất hiện trong bản đồ trao đổi chất của chủng *Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67, cạnh con đường phân hủy clorocyclohexan và clorobenzen.

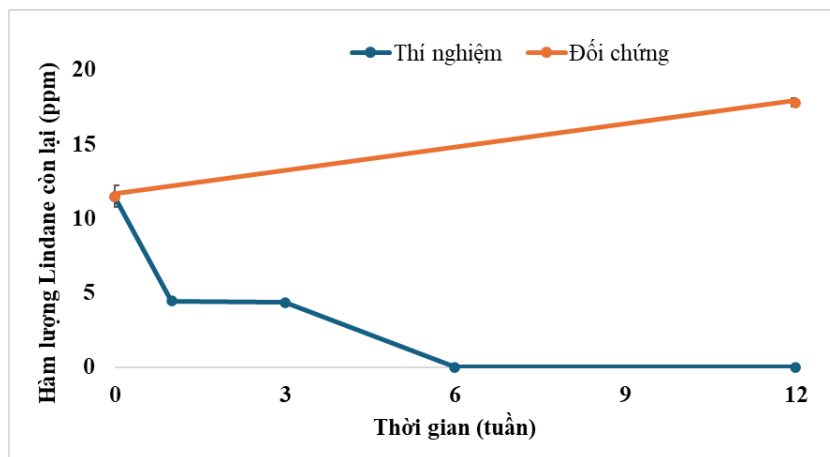
Enzyme 3-hydroxybenzoate 6-monooxygenase (đường màu xanh lá (5), Hình 3.44) là một trong số những enzyme đặc trưng của chủng *Streptomyces marianii* DDT21 tham gia vào quá trình dị hóa hợp chất có vòng thơm đặc biệt trong quá trình chuyển hóa các dẫn xuất hydroxybenzoate – những chất thường hình thành sau khi DDT và các hợp chất chứa chloride hóa bị khử chloride và oxy hóa từng phần. Đây cũng là enzyme chỉ xuất hiện ở chủng *Streptomyces marianii* DDT21 càng chứng tỏ tầm quan trọng của việc bổ sung chủng *Streptomyces marianii* DDT21 trong tổ hợp.

Enzyme 4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase (đường màu đen (6), Hình 3.44) là một trong số những enzyme đặc trưng phân hủy hợp chất có vòng thơm thành acetaldehyde và pyruvate và được sinh bởi 2 chủng trung tâm là *Streptomyces marianii* DDT21 và *Cupriavidus metallidurans* TN030.

Có thể nhận thấy rằng, sự phối hợp giữa các chủng vi sinh vật làm gia tăng tính đa dạng của các con đường chuyển hóa, qua đó không chỉ nâng cao hiệu quả phân giải mà còn giúp các chủng thích nghi tốt hơn với các điều kiện môi trường khác nhau. Ngoài ra, việc bổ sung thêm Tween 80 và môi trường 70% độ ẩm giúp tạo môi trường kị khí và tăng khả năng tiếp xúc của các chủng vi sinh vật với DDT. Từ đó, tăng cường hiệu quả phân giải DDT của chế phẩm HD4.

3.3.5.2 Bước đầu thử nghiệm xử lý đất ô nhiễm Lindane trên mô hình thực tế

Kết quả (Hình 3.45) cho thấy hàm lượng Lindane trong đất tại lô thí nghiệm giảm rất nhanh so với lô đối chứng. Ban đầu, nồng độ Lindane là khoảng 11,5 ppm, giảm xuống còn khoảng 4 ppm sau 1 tuần, duy trì ở mức này đến tuần thứ 3 và giảm xuống mức < 1 ppm, gần như không còn phát hiện ở tuần thứ 6 cũng như tuần thứ 12 (hiệu suất phân giải đạt >90%). Ngược lại, lô đối chứng lại có xu hướng tăng nhẹ từ khoảng 12 ppm lên 20 ppm trong suốt thời gian thí nghiệm. Do tuần thứ 6 không phát hiện thấy Lindane ở lô thí nghiệm nên chúng tôi tiến hành lấy mẫu sâu hơn vào tuần thứ 12, có lẽ do đó thấy nồng độ Lindane trong mẫu đối chứng có tăng nhẹ; trong khi đó trong mẫu thí nghiệm thì hàm lượng Lindane vẫn ở dưới ngưỡng phát hiện được.

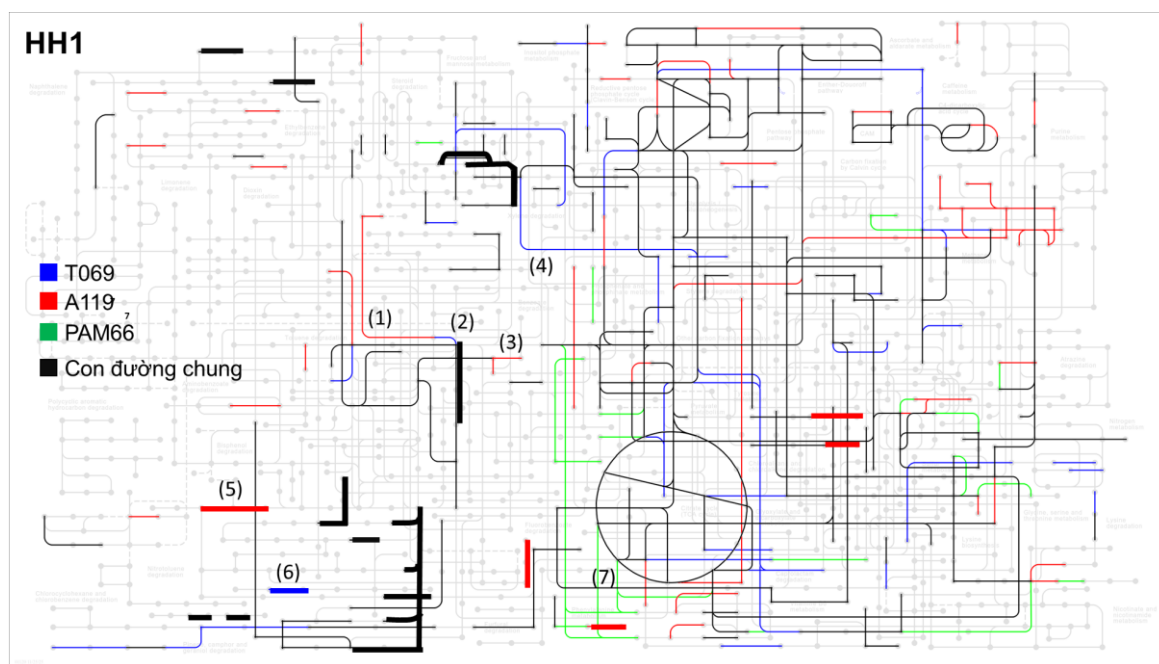


Hình 3.45. Hàm lượng Lindane còn lại trong đất theo thời gian

So với mô hình thực nghiệm trong phòng thí nghiệm, nơi chế phẩm HH1 đạt hiệu suất phân giải khoảng 75% sau 21 ngày, hiệu quả xử lý trong điều kiện thực tế cho thấy xu hướng cao hơn khi thời gian theo dõi được kéo dài. Sự khác biệt này có thể do trong mô hình thực địa, mặc dù điều kiện môi trường phức tạp hơn, nhưng thời gian xử lý dài hơn đã tạo điều kiện cho tổ hợp vi sinh vật thích nghi tốt với nền đất ô nhiễm và phát huy hiệu quả phân giải ổn định hơn. Ngoài ra, trong điều kiện tự nhiên, các yếu tố như độ thoáng khí của đất, hoạt động của hệ vi sinh vật bản địa và sự biến động độ ẩm có thể góp phần hỗ trợ quá trình chuyển hóa các hợp chất chloride hữu cơ. Kết quả này cho thấy chế phẩm HH1 có khả năng ứng dụng thực tế cao và duy trì hiệu quả xử lý bền vững trong điều kiện ngoài hiện trường.

Tổ hợp HH1 gồm các chủng *Pseudomonas putida* T069, *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* PAM66. Như đã phân tích ở trên, hai chủng *Pseudomonas putida* T069 và A119 đóng vai trò chính và sự kết hợp thêm chủng *Pseudomonas putida* PAM66 nhằm hỗ trợ tăng tiềm năng trao đổi chất và tăng khả năng thích nghi của hỗn hợp với các điều kiện môi trường khác nhau. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy sự vượt trội của hỗn hợp vi sinh vật so với đơn chủng, đặc biệt trong phân giải chất ô nhiễm khó xử lý. Nghiên cứu về khả năng phân giải Hexadecane cho thấy sự phối hợp các đơn chủng làm tăng cường khả năng phân giải Hexadecane [110]. Đối với Lindane, nghiên cứu về khả năng đồng xử lý Cr(VI) và Lindane cho

thấy hỗn hợp VSV chứa bốn chủng *Streptomyces* sp. M7, MC1, A5 and *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 có khả năng phân giải Cr(VI) và Lindane tốt nhất tương tự như đơn chủng tốt nhất (*Streptomyces* sp. MC1). Đồng thời, sự có mặt đồng thời của 4 chủng vi sinh vật đã giúp gia tăng thời gian sống sót của các chủng xạ khuẩn này trong điều kiện đất thực tế [17].



Hình 3.46. Bản đồ chuyển hóa các chủng của tổ hợp HH1

Ghi chú: (1) 2-aminobenzoate-CoA ligase; (2) 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)hexa-2,4-dienoate hydrolase; (3) vanillin dehydrogenase; (4) glutaryl-CoA transferase; (5) haloalkane dehalogenase; (6) tetrachlorobenzoquinone reductase; (7) 2-hydroxy-6-oxonona-2,4-dienedioate hydrolase.

Khi phân tích bản đồ chuyển hóa các chủng của tổ hợp HH1 có thể thấy, hai chủng lõi *Pseudomonas putida* T069 và *Streptomyces katrae* A119 hỗ trợ cho nhau trong một số con đường, bao gồm các con đường chuyển hóa cacbon như chu trình pentose phosphate, cũng như các con đường chuyển hóa các hợp chất ngoại lai, điển hình như con đường phân hủy benzoate (Hình 3.46). Ví dụ, trong con đường phân hủy benzoate, *Streptomyces katrae* A119 có enzyme 2-aminobenzoate-CoA ligase (đường màu đỏ (1), Hình 3.46) xúc tác tạo anthranilate, chất này sau đó có thể được

sử dụng bởi enzyme 6-oxo-6-(2'-aminophenyl) hexa-2,4-dienoate hydrolase (đường màu xanh (2), Hình 3.46) của *Pseudomonas putida* T069. Những kết nối chuyển hóa này trong quá trình chuyển hóa các hợp chất ngoại lai, cùng với một số kết nối khác, có thể tiếp tục được liên thông với các con đường chuyển hóa trung tâm thông qua enzyme vanillin dehydrogenase (đường màu đỏ (3), Hình 3.46) của chủng *Streptomyces*. Ngoài ra, *Pseudomonas putida* T069 sở hữu một enzyme quan trọng là glutaryl-CoA transferase (đường màu xanh (4), Hình 3.46), có vai trò kết nối một nhánh khác của các con đường chuyển hóa hợp chất ngoại lai với các con đường chuyển hóa trung tâm (Hình 3.46).

Một điểm đáng lưu ý khác liên quan đến các con đường sinh tổng hợp histidine, một axit amin quan trọng trong chuyển hóa các hợp chất chứa vòng thơm, đó là: T069 thiếu enzyme thủy phân histidinol-phosphate thành L-histidinol, trong khi chủng *Streptomyces katrae* A119 có thể cung cấp enzyme này. Bản thân A119 còn đóng góp một số con đường đặc thù trong chuyển hóa methane (Hình 3.9A–C; xem cụm các đường màu đỏ ở góc trên bên phải của mỗi bản đồ) cho bất kỳ hỗn hợp nào. Xét về chuyển hóa các hợp chất khó xử lý, *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* T069 cũng lần lượt bổ sung các enzyme riêng biệt của mình như haloalkane dehalogenase (đường màu đỏ (5), Hình 3.46) và tetrachlorobenzoquinone reductase (đường màu xanh (6), Hình 3.46) vào mạng lưới chuyển hóa tổng thể.

Có lẽ những sự phối hợp đa dạng trong tính bổ trợ chuyển hóa giữa *Pseudomonas putida* T069 và *Streptomyces katrae* A119 cho thấy việc lựa chọn chúng làm các chủng lõi là một chiến lược đúng đắn cho việc xây dựng hỗn hợp vi sinh vật, và việc kết hợp hai chủng này sẽ cho phép quá trình chuyển hóa (phân hủy) Lindane diễn ra đầy đủ hơn. Ngoài ra, chủng còn lại, *Pseudomonas putida* PAM66, cũng giúp bổ sung thêm một số enzyme đặc trưng như 2-hydroxy-6-oxonona-2,4-dienedioate hydrolase (đường xanh lá (7), Hình 3.46) thuộc các con đường phân hủy các hợp chất chứa vòng thơm.

Sự kết hợp giữa các chủng vi sinh vật đã mở rộng phổ con đường chuyển hóa, từ đó tăng hiệu quả xử lý chất ô nhiễm và đồng thời nâng cao khả năng thích nghi của hỗn hợp trong các điều kiện môi trường biến động. Ngoài ra, việc bổ sung thêm Tween 80 và môi trường 70% độ ẩm giúp tạo môi trường kỵ khí và tăng khả năng tiếp xúc của các chủng vi sinh vật với Lindane. Từ đó, tăng cường hiệu quả phân giải Lindane của chế phẩm HH1.

3.4 Thảo luận chung

Luận án đã ứng dụng thành công cách tiếp cận genome-mining trong tuyển chọn và xây dựng các tổ hợp vi sinh vật phân giải DDT hoặc Lindane. Khác với các phương pháp truyền thống chủ yếu dựa trên làm giàu quần xã tại chỗ hoặc phối hợp ngẫu nhiên các chủng có hoạt tính cao, nghiên cứu đã kết hợp dữ liệu giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) với phân tích chú giải chức năng để dự đoán các enzyme tham gia phân giải, các con đường chuyển hóa và mối quan hệ hỗ trợ về trao đổi chất giữa các chủng vi sinh vật. Trên cơ sở đó, các tổ hợp vi sinh vật có hiệu quả phân giải cao và khả năng thích nghi tốt với điều kiện môi trường đã được thiết kế hợp lý và phát triển thành chế phẩm sinh học ứng dụng xử lý đất ô nhiễm DDT và Lindane.

Một trong những điểm mới nổi bật của luận án là việc khai thác cơ sở dữ liệu KEGG để xây dựng bản đồ chuyển hóa và dự đoán tương tác trao đổi chất giữa nhiều chủng vi sinh vật từ dữ liệu hệ gen, làm cơ sở cho việc thiết kế tổ hợp chủng một cách có định hướng. Cách tiếp cận sử dụng CSDL KEGG cho dữ liệu genome để thiết lập bản đồ chuyển hóa và dự đoán tương tác trao đổi chất giữa nhiều các chủng vi sinh vật khác nhau chưa từng được đề cập tới trong các nghiên cứu trước đây và là một trong những tính mới nổi bật của nghiên cứu này. Nhờ đó, việc xây dựng tổ hợp vi sinh vật không còn dựa trên sự kết hợp ngẫu nhiên các chủng có hoạt tính tốt mà dựa trên cơ sở khoa học về sự hỗ trợ chức năng và tương tác chuyển hóa, góp phần nâng cao hiệu quả phân hủy và khả năng thích nghi của chế phẩm trong điều kiện thực tế.

Một trong những kết quả nổi bật của luận án là các tổ hợp vi sinh vật đều cho hiệu quả phân giải DDT hoặc Lindane cao hơn các đơn chủng thành phần. Điều này cho thấy việc thiết kế tổ hợp dựa trên phân tích khả năng bổ trợ về trao đổi chất nhờ genome-mining đã góp phần tạo ra các tổ hợp với các con đường phân giải tổng thể được hoàn thiện hơn, giảm tích lũy các chất trung gian và nâng cao hiệu quả khoáng hóa. Đồng thời, các tổ hợp được lựa chọn còn tăng khả năng duy trì hiệu quả trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau và đạt hiệu quả xử lý cao khi bước đầu thử nghiệm ngoài thực địa.

Bên cạnh những kết quả đạt được, luận án vẫn còn một số hạn chế cần tiếp tục nghiên cứu:

(i) Thứ nhất, tỷ lệ protein giả định (*hypothetical protein*) sau chú giải hệ gen bằng Prokka còn khá cao (34,28–50,50%), phản ánh hạn chế của các cơ sở dữ liệu hiện có đối với các vi sinh vật môi trường. Điều này cho thấy vẫn có thể tồn tại nhiều enzyme hoặc con đường chuyển hóa liên quan đến phân giải DDT và Lindane chưa được nhận diện. Trong các nghiên cứu tiếp theo, việc kết hợp các cơ sở dữ liệu cập nhật cùng các kỹ thuật đa omics như transcriptomics, proteomics và metabolomics sẽ giúp nâng cao độ chính xác của việc chú giải và dự đoán chức năng gen.

(ii) Thứ hai, mặc dù genome-mining đã dự đoán được nhiều gen và enzyme tiềm năng tham gia vào quá trình phân giải DDT và Lindane, vai trò cụ thể cũng như cơ chế điều hòa biểu hiện của các gen này vẫn chưa được xác nhận bằng thực nghiệm. Kết hợp kết quả phân tích hệ gen với các sản phẩm trung gian xác định bằng GC-MS cho phép đề xuất giả thiết về con đường phân giải của các tổ hợp vi sinh vật. Tuy nhiên, các giả thuyết này vẫn cần được kiểm chứng thêm bằng các nghiên cứu chức năng và phân tích biểu hiện gen trước khi có thể khẳng định vai trò của các enzyme cụ thể trong quá trình phân giải Lindane.

(iii) Thứ ba, về khía cạnh ứng dụng, các chủng sử dụng trong nghiên cứu đều được phân lập từ các khu vực đất ô nhiễm tại Việt Nam nên có khả năng thích nghi tốt với điều kiện môi trường bản địa. Các chủng cũng đã được sàng lọc về khả năng

tương thích trong tổ hợp nhằm hạn chế hiện tượng đối kháng giữa các chủng thành phần. Mặt khác, mặc dù các chủng sử dụng cho các tổ hợp đều thuộc các loài được đánh giá là an toàn cho người theo BMBL (CDC Hoa Kỳ), vẫn cần có thêm các đánh giá về an toàn sinh học như về ảnh hưởng của các chủng đến cấu trúc quần xã vi sinh vật bản địa. Đây là những nội dung cần được nghiên cứu bổ sung trước khi triển khai ứng dụng trên quy mô lớn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

[1] Đã làm rõ tiềm năng của các chủng vi sinh vật phân lập từ các điểm ô nhiễm tại Việt Nam trong việc phân hủy DDT hoặc Lindane thông qua cách tiếp cận genome-mining kết hợp phân tích hệ gen và dự đoán tương tác trao đổi chất. Trên cơ sở đó, 10 tổ hợp chủng tiềm năng phân giải DDT từ 10 chủng tuyển chọn có khả năng phân giải hiệu quả DDT và 10 tổ hợp chủng tiềm năng phân giải Lindane từ 10 chủng tuyển chọn có khả năng phân giải hiệu quả Lindane đã được xây dựng.

[2] Chế phẩm xử lý hiệu quả DDT là chế phẩm tổ hợp HD4, bao gồm các chủng *Streptomyces marianii* DDT21, *Cupriavidus metallidurans* TN030, *Pseudomonas nitroreducens* Y077, *Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67 và *Stenotrophomonas maltophilia* Y042. Chế phẩm xử lý hiệu quả Lindane là chế phẩm tổ hợp HH1, bao gồm các chủng *Pseudomonas putida* T069, *Streptomyces katrae* A119 và *Pseudomonas putida* PAM66.

[3] Đã xây dựng được quy trình sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ xử lý ô nhiễm đất chứa DDT và Lindane. Môi trường phù hợp nhất sử dụng cho lên men tạo sinh khối các chủng là môi trường tối thiểu MSM cải tiến với nguồn cacbon là rỉ đường và nguồn nitơ là $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$. Công thức phối trộn chế phẩm phù hợp là 10 than bùn : 1 sinh khối. Sau phối trộn, chế phẩm được sấy ở nhiệt độ 40°C trong 3 giờ để hoàn thiện.

[4] Đã xây dựng được các quy trình công nghệ xử lý đất ô nhiễm DDT hoặc Lindane bằng chế phẩm sinh học, trong đó quy trình xử lý đất ô nhiễm DDT sử dụng 5% chế phẩm HD4 và quy trình xử lý đất ô nhiễm Lindane sử dụng 1% chế phẩm HH1, kết hợp điều chỉnh độ ẩm đất đến 70% và bổ sung Tween 80 ở tỷ lệ 0,1%. Kết quả bước đầu thử nghiệm tại các mô hình thực tế cho thấy các quy trình có hiệu quả xử lý cao: tại mô hình xử lý đất nhiễm DDT ở xã Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An, sau 12 tuần nồng độ DDT giảm khoảng 85%, xuống còn 2,8 ppm; tại mô hình xử lý đất

nhiễm Lindane ở xã Việt Xuyên, tỉnh Hà Tĩnh, sau 12 tuần nồng độ Lindane giảm trên 90%, xuống dưới giới hạn phát hiện.

Kiến nghị

- + Nghiên cứu sâu, làm rõ hơn các con đường phân giải của các chủng và tổ hợp chủng được lựa chọn và bản chất di truyền liên quan.
- + Tối ưu hóa quy trình sản xuất chế phẩm và quy trình xử lý đất ô nhiễm để tiết kiệm chi phí hơn nữa.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Phuong Ha Vu**, Dang Huy Nguyen, Tung Son Vu, Anh Hien Le, Trang Quynh Thi Tran, Yen Thi Nguyen, Thuy Thu Thi Nguyen, Linh Dam Thi Mai, Ha Viet Thi Bui, Hanh My Tran, Huy Quang Nguyen, Thao Kim Nu Nguyen, Bao Gia Truong, Huyen Thanh Thi Tran, Hai The Pham. Biodegradation of DDT using multi-species mixtures: From genome-mining prediction to practical assessment. *Microbial Biotechnology*, 2024, 17.9: e70021.
2. **Phuong Ha Vu**, Hai Hoang Pham, Tung Son Vu, Anh Hien Le, Dong Tran Luu, Trang Quynh Thi Tran, Yen Thi Nguyen, Thuy Thu Thi Nguyen, Linh Dam Thi Mai, Ha Viet Thi Bui, Hanh My Tran, Huy Quang Nguyen, Thao Kim Nu Nguyen, Anh Thuy Thi Tran, Huyen Thanh Thi Tran, Hai The Pham. Mixed Cultures for Biodegradation of Lindane: From Genome-Based Assembly to Practical Assessment. *Remediation Journal*, 2025, 35.2: e70010
3. **Vũ Hà Phương**, Trần Tiến Thành, Hà Đình Lương, Nguyễn Kim Nữ Thảo, Trần Thị Thanh Huyền, Phạm Thế Hải. Nghiên cứu các phương án chất mang và chất hoạt động bề mặt phù hợp nhằm phát triển chế phẩm vi sinh xử lý ô nhiễm DDT và Lindane. *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học 2025*, 2025, Tập 1, tr.632-637
4. **Phuong Ha Vu**, Linh Phuong Tran, Tung Son Vu, Trang Quynh Thi Tran, Yen Thi Nguyen, Anh Quynh Hoang, Thao Kim Nu Nguyen, Minh Hong Nguyen, Song-Gun Kim, Huyen Thanh Thi Tran and Hai Pham. Discovery of a notable DDT-degrading bacterium originating from insecticide-contaminated soil in Vietnam and representing a novel species. *Frontiers in Microbiology, section Terrestrial Microbiology*, 2026,17, 1744811

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Đào Thị Ngọc Ánh và Đặng Thị Cẩm Hà (2009), "Khả năng phân hủy DDT của chủng nấm sợi FNA1 phân lập từ đất nhiễm hỗn hợp thuốc trừ sâu tại Nghệ An", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thái Nguyên*, 57(9), tr. 46-51.
2. Lưu Trần Đông (2023), *Tuyển chọn, nghiên cứu đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của các chủng vi sinh vật nhân sơ có khả năng phân giải gamma-hexachlorocyclohexane (Lindane)*, Luận văn Thạc sỹ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN
3. Đặng Thị Cẩm Hà, Phạm Quốc Hiệp, Nguyễn Nguyên Quang, Trần Thị Như Hòa và Nghiêm Ngọc Minh (2009), "Phân lập và đánh giá khả năng phân hủy hexachlorocyclohexane của chủng nấm sợi FNA33 từ đất xử lý khử độc thuốc trừ sâu bằng bioreactor hiếu khí. ", *Vietnam Journal of Biotechnology*, tr. 257-264.
4. Trương Phước Thiên Hoàng và Lê Phước Thọ (2021), "Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(11), tr. 1509-1521.
5. Lê Đoàn Thị Tuyết, Phạm Vũ Bảo, Nguyễn Ngọc Tùng và Đỗ Minh Anh (2020), "Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men rẽ tiền chủng *Bacillus subtilis* LH1 bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm phục vụ sản xuất Probiotic", *Tạp chí Khoa học Lạc Hồng*, 9, tr. 37-40.
6. Nguyễn Thị Hằng Nga, Nguyễn Lan Hương, Trần Khắc Hiệp, Nguyễn Kiều Băng Tâm và Lương Hữu Thành (2016), "Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật để xử lý phế thải rắn sau chế biến tinh bột sắn làm phân hữu cơ sinh học", *VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences*, 32(1S).
7. Nguyễn Thị Ngọc Sương, Phương Nguyễn Đỗ Thanh và My Trần Hải (2023), "Tạo chế phẩm sinh học từ giống vi khuẩn *Bacillus* spp. và *Pseudomonas* spp.

- có khả năng hòa tan lân", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh*, (3 (81)), tr. 100-100.
8. Trần Linh Thước (2006), *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, Giáo dục.
 9. Vũ Sơn Tùng (2024), *Nghiên cứu chọn tạo bộ giống vi khuẩn phân hủy hiệu quả DDT nhằm phục vụ xử lý đất nông nghiệp ô nhiễm*, Luận văn Thạc sỹ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

Tiếng Anh

10. Abdul Salam J., V. Lakshmi, D. Das, and N. Das (2013), "Biodegradation of lindane using a novel yeast strain, *Rhodotorula* sp. VITJzN03 isolated from agricultural soil", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(3), pp. 475-487.
11. Aloo B.N., E.R. Mbega, B.A. Makumba, and J.B. Tumuhairwe (2022), "Effects of carrier materials and storage temperatures on the viability and stability of three biofertilizer inoculants obtained from potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere", *Agriculture*, 12(2), pp. 140.
12. Altman T., M. Travers, A. Kothari, R. Caspi, and P.D. Karp (2013), "A systematic comparison of the MetaCyc and KEGG pathway databases", *BMC Bioinformatics*, 14(1), pp. 112.
13. Alvarez A., C.S. Benimeli, J.M. Saez, M.S. Fuentes, S.A. Cuozzo, M.A. Polti, and M.J. Amoroso (2012), "Bacterial bio-resources for remediation of hexachlorocyclohexane", *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), pp. 15086-15106.
14. An H.-R., H.-J. Park, and E.-S. Kim (2001), "Cloning and expression of thermophilic catechol 1, 2-dioxygenase gene (catA) from *Streptomyces setonii*", *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), pp. 17-22.
15. Aparicio J.D., C.S. Benimeli, C.A. Almeida, M.A. Polti, and V.L. Colin (2017), "Integral use of sugarcane vinasse for biomass production of

- actinobacteria: Potential application in soil remediation", *Chemosphere*, 181, pp. 478-484.
16. Aparicio J.D., E.E. Raimondo, J.M. Saez, S.B. Costa-Gutierrez, A. Alvarez, C.S. Benimeli, and M.A. Polti (2022), "The current approach to soil remediation: A review of physicochemical and biological technologies, and the potential of their strategic combination", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(2), pp. 107141.
 17. Aparicio J.D., J.M. Saez, E.E. Raimondo, C.S. Benimeli, and M.A. Polti (2018), "Comparative study of single and mixed cultures of actinobacteria for the bioremediation of co-contaminated matrices", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), pp. 2310-2318.
 18. Awasthi N., R. Ahuja, and A. Kumar (2000), "Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfan isomers", *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11-12), pp. 1697-1705.
 19. Bajaj A., S. Mayilraj, M.K.R. Mudiam, D.K. Patel, and N. Manickam (2014), "Isolation and functional analysis of a glycolipid producing *Rhodococcus* sp. strain IITR03 with potential for degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT)", *Bioresource Technology*, 167, pp. 398-406.
 20. Benimeli C., A. González, A. Chaile, and M. Amoroso (2007), "Temperature and pH effect on lindane removal by *Streptomyces* sp. M7 in soil extract", *Journal of Basic Microbiology*, 47(6), pp. 468-473.
 21. Benimeli C.S., G.R. Castro, A.P. Chaile, and M. Amoroso (2007), "Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. strain M7", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(2), pp. 148-155.
 22. Bergmann J. and J. Sanik (1957), "Determination of trace amounts of chlorine in naphtha", *Analytical Chemistry*, 29(2), pp. 241-243.
 23. Berninger T., Ó. González López, A. Bejarano, C. Preininger, and A. Sessitsch (2018), "Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-

- sporulating bacterial inoculants", *Microbial Biotechnology*, 11(2), pp. 277-301.
24. Betancur-Corredor B., N.J. Pino, S. Cardona, and G.A. Peñuela (2015), "Evaluation of biostimulation and Tween 80 addition for the bioremediation of long-term DDT-contaminated soil", *Journal of Environmental Sciences*, 28, pp. 101-109.
 25. Beuker J., A. Steier, A. Wittgens, F. Rosenau, M. Henkel, and R. Hausmann (2016), "Integrated foam fractionation for heterologous rhamnolipid production with recombinant *Pseudomonas putida* in a bioreactor", *Amb Express*, 6(1), pp. 11.
 26. Beyer A. and M. Matthies (2001), "Long-range transport potential of semivolatile organic chemicals in coupled air-water systems", *Environmental Science and Pollution Research*, 8(3), pp. 173-179.
 27. Bhuyan S., B. Sreedharan, T.K. Adhya, and N. Sethunathan (1993), "Enhanced biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) in HCH (commercial) acclimatized flooded soil: Factors affecting its development and persistence", *Pesticide Science*, 38(1), pp. 49-55.
 28. Bidlan R. and H. Manonmani (2002), "Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P", *Process Biochemistry*, 38(1), pp. 49-56.
 29. Boul H.L. (1996), "Effect of soil moisture on the fate of radiolabelled DDT and DDE in vitro", *Chemosphere*, 32(5), pp. 855-866.
 30. Brovelli A., D. Barry, C. Robinson, and J. Gerhard (2012), "Analysis of acidity production during enhanced reductive dechlorination using a simplified reactive transport model", *Advances in Water Resources*, 43, pp. 14-27.
 31. Bumpus J.A. and S.D. Aust (1987), "Biodegradation of DDT [1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*", *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9), pp. 2001-2008.

32. Camacho-Pérez B., E. Ríos-Leal, N. Rinderknecht-Seijas, and H.M. Poggi-Varaldo (2012), "Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: a mini review", *Journal of Environmental Management*, 95, pp. S306-S318.
33. Cameotra S.S. and P. Singh (2009), "Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species", *Microbial Cell Factories*, 8(1), pp. 16.
34. Cao F., F. Li, T. Liu, D. Huang, C. Wu, C. Feng, and X. Li (2010), "Effect of *Aeromonas hydrophila* on reductive dechlorination of DDTs by zero-valent iron", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), pp. 12366-12372.
35. Chakraborty S., K. Karmakar, and D. Chakravorty (2014), "Cells producing their own nemesis: understanding methylglyoxal metabolism", *IUBMB life*, 66(10), pp. 667-678.
36. Chattopadhyay S. and D. Chattopadhyay (2015), "Remediation of DDT and its metabolites in contaminated sediment", *Current Pollution Reports*, 1(4), pp. 248-264.
37. Chen P.T., C.J. Chiang, and Y.P. Chao (2007), "Medium optimization for the production of recombinant nattokinase by *Bacillus subtilis* using response surface methodology", *Biotechnology Progress*, 23(6), pp. 1327-1332.
38. Dang H.M., C.H. Vo, Y. Inagaki, N.T. Dao, T.D. Tran, T.M. Tran, T.T. Nguyen, H.T.T. Ho, V.D. Tran, and Y. Sakakibara (2022), "Phyto-Fenton remediation of a dichloro-diphenyl-trichloroethane contaminated site in Ha Tinh Province, Vietnam", *Scientific Reports*, 12(1), pp. 16460.
39. De Paolis M., D. Lippi, E. Guerriero, C. Polcaro, and E. Donati (2013), "Biodegradation of α -, β -, and γ -hexachlorocyclohexane by *Arthrobacter fluorescens* and *Arthrobacter giacomelloi*", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(3), pp. 514-524.
40. Deroiné M., G. César, A. Le Duigou, P. Davies, and S. Bruzard (2015), "Natural degradation and biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-

- hydroxyvalerate) in liquid and solid marine environments", *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), pp. 493-505.
41. Dilokpimol A., M.R. Mäkelä, M.V. Aguilar-Pontes, I. Benoit-Gelber, K.S. Hildén, and R.P. De Vries (2016), "Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications", *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), pp. 231.
 42. Ding Y., S. Qin, H. Huang, X. Tang, X. Li, Y. Zhang, W. Chen, L.-P. Nguyen, and S. Qi (2024), "Selected pesticidal POPs and metabolites in the soil of five Vietnamese cities: sources, fate, and health risk implications", *Environmental Pollution*, 342, pp. 123043.
 43. Donets M.M. and V.Y. Tsygankov (2023), "Organochlorine compounds in the Amur (Heilong) river basin (2000–2020): a review", *Journal of Xenobiotics*, 13(3), pp. 439-462.
 44. Dong X. and M. Strous (2019), "An integrated pipeline for annotation and visualization of metagenomic contigs", *Frontiers in Genetics*, 10, pp. 999.
 45. Elcey C.D. and A.M. Kunhi (2010), "Substantially enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers by a microbial consortium on acclimation", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), pp. 1046-1054.
 46. Fang H., B. Dong, H. Yan, F. Tang, and Y. Yu (2010), "Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil", *Journal of Hazardous Materials*, 184(1-3), pp. 281-289.
 47. Fiedler H. (2002), *Dioxins and furans (PCDD/PCDF)*, in *Persistent Organic Pollutants*, Springer. p. 123-201.
 48. Fuentes M.S., J.M. Sáez, C.S. Benimeli, and M.J. Amoroso (2011), "Lindane biodegradation by defined consortia of indigenous *Streptomyces* strains", *Water, Air, & Soil Pollution*, 222(1), pp. 217-231.
 49. Garcia Lara B., K. Wrobel, A.R. Corrales Escobosa, O. Serrano Torres, I. Enciso Donis, and K. Wrobel (2021), "Mass spectrometry-based identification

- of bacteria isolated from industrially contaminated site in Salamanca (Mexico) and evaluation of their potential for DDT degradation", *Folia Microbiologica*, 66(3), pp. 355-369.
50. Geueke B., N. Garg, S. Ghosh, T. Fleischmann, C. Holliger, R. Lal, and H.P.E. Kohler (2013), "Metabolomics of hexachlorocyclohexane (HCH) transformation: ratio of LinA to LinB determines metabolic fate of HCH isomers", *Environmental Microbiology*, 15(4), pp. 1040-1049.
 51. Gómez-Lavín S., M.F. San Román, I. Ortiz, J. Fernández, P. De Miguel, and A. Urtiaga (2018), "Dioxins and furans legacy of lindane manufacture in Sabiñánigo (Spain). The Bailín landfill site case study", *Science of The Total Environment*, 624, pp. 955-962.
 52. Gong T., R. Liu, Z. Zuo, Y. Che, H. Yu, C. Song, and C. Yang (2016), "Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for complete mineralization of methyl parathion and γ -hexachlorocyclohexane", *ACS Synthetic Biology*, 5(5), pp. 434-442.
 53. Gopalakrishnan S., A. Sathya, R. Vijayabharathi, and V. Srinivas (2016), *Formulations of plant growth-promoting microbes for field applications*, in *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*, Springer. p. 239-251.
 54. Guo P., W. Chen, Y. Li, T. Chen, L. Li, and G. Wang (2014), "Selection of surfactant in remediation of DDT-contaminated soil by comparison of surfactant effectiveness", *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), pp. 1370-1379.
 55. Häggblom M.M. and I.D. Bossert (2003), *Halogenated organic compounds-a global perspective*, in *Dehalogenation: microbial processes and environmental applications*, Springer. p. 3-29.
 56. Harada T., M. Takeda, S. Kojima, and N. Tomiyama (2016), "Toxicity and carcinogenicity of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)", *Toxicological Research*, 32(1), pp. 21-33.

57. Hay A.G. and D.D. Focht (2000), "Transformation of 1, 1-dichloro-2, 2-(4-chlorophenyl) ethane (DDD) by *Ralstonia eutropha* strain A5", *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), pp. 249-253.
58. Inoue Y. and A. Kimura (1995), "Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms", *Advances in Microbial Physiology*, 37, pp. 177-227.
59. Irfan M., U. Asghar, M. Nadeem, R. Nelofer, and Q. Syed (2016), "Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation", *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), pp. 139-147.
60. Ito K., A. Mahmood, R. Kataoka, and K. Takagi (2021), "Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) degradation by *Streptomyces* sp. isolated from DDT contaminated soil", *Bioremediation Journal*, 25(2), pp. 148-158.
61. John E.M. and J.M. Shaike (2015), "Chlorpyrifos: pollution and remediation", *Environmental Chemistry Letters*, 13(3), pp. 269-291.
62. Kamanavalli C.M. and H.Z. Ninnekar (2004), "Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* species", *Current Microbiology*, 48(1), pp. 10-13.
63. Kaur R., R. Salwan, and V. Sharma (2022), "Structural properties, genomic distribution of laccases from *Streptomyces* and their potential applications", *Process Biochemistry*, 118, pp. 133-144.
64. Kumar D., S. Jaswal, and S. Chopra (2017), "Co-degradation study of lindane and chlorpyrifos by novel bacteria", *International Journal of Environment and Waste Management*, 20(4), pp. 283-299.
65. Lee J.A., H.U. Kim, J.-G. Na, Y.-S. Ko, J.S. Cho, and S.Y. Lee (2023), "Factors affecting the competitiveness of bacterial fermentation", *Trends in Biotechnology*, 41(6), pp. 798-816.
66. Łomża P., T. Krucoń, and A. Tabernacka (2023), "Potential of microbial communities to perform dehalogenation processes in natural and

- anthropogenically modified environments—A metagenomic study", *Microorganisms*, 11(7), pp. 1702.
67. Louis P., H. Trüper, and E. Galinski (1994), "Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(6), pp. 684-688.
 68. Ma K., W. Chen, S.-Q. Yan, X.-Q. Lin, Z.-Z. Liu, J.-B. Zhang, Y. Gao, and Y.-J. Yang (2022), "Genome mining reveals polysaccharide-degrading potential and new antimicrobial gene clusters of novel intestinal bacterium *Paenibacillus jilinensis* sp. nov", *BMC Genomics*, 23(1), pp. 380.
 69. Madigan M., *Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River: Prentice Hall*. 2012, Inc.
 70. Madigan M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap, and D.P. Clark (2008), "Brock biology of microorganisms 12th edn", *Int. Microbiol*, 11(1).
 71. Mahugija J.A. (2013), "Status and distributions of pesticides buried at five sites in Arusha and Mbeya regions, Tanzania", *Afr J Pure Appl Chem*, 7(12), pp. 382-93.
 72. Malik A., F. Masood, and E. Grohmann (2013), *Management of microbial resources in the environment: a broad perspective*, in *Management of Microbial Resources in the Environment*, Springer. p. 1-15.
 73. Mansouri A., M. Cregut, C. Abbes, M.-J. Durand, A. Landoulsi, and G. Thouand (2017), "The environmental issues of DDT pollution and bioremediation: a multidisciplinary review", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(1), pp. 309-339.
 74. Mbarki K., M. Fersi, I. Louati, B. Elleuch, and A. Sayari (2021), "Biodegradation study of PDLA/cellulose microfibrils biocomposites by *Pseudomonas aeruginosa*", *Environmental Technology*, 42(5), pp. 731-742.
 75. Mercado-Blanco J. and P.A. Bakker (2007), "Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection", *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92(4), pp. 367-389.

76. Meyer-Dombard D., E. Shock, and J. Amend (2012), "Effects of trace element concentrations on culturing thermophiles", *Extremophiles*, 16(2), pp. 317-331.
77. Minh T.B., H. Iwata, S. Takahashi, P.H. Viet, B.C. Tuyen, and S. Tanabe (2008), "Persistent organic pollutants in Vietnam: environmental contamination and human exposure", *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 213-290.
78. Morgan C.A., N. Herman, P. White, and G. Vesey (2006), "Preservation of micro-organisms by drying; a review", *Journal of microbiological methods*, 66(2), pp. 183-193.
79. Murthy H.R. and H. Manonmani (2007), "Aerobic degradation of technical hexachlorocyclohexane by a defined microbial consortium", *Journal of Hazardous Materials*, 149(1), pp. 18-25.
80. Nadeau L.J., F.-M. Menn, A. Breen, and G. Sayler (1994), "Aerobic degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5", *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), pp. 51-55.
81. Nagata Y., R. Endo, M. Ito, Y. Ohtsubo, and M. Tsuda (2007), "Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), pp. 741-752.
82. Nolan K., J. Kamrath, and J. Levitt (2012), "Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature", *Pediatric Dermatology*, 29(2), pp. 141-146.
83. Omarini A.B., F. Achimón, V.D. Brito, and J.A. Zygodlo (2020), "Fermentation as an Alternative Process for the Development of Bioinsecticides", *Fermentation*, 6(4), pp. 120.
84. Pan X., D. Lin, Y. Zheng, Q. Zhang, Y. Yin, L. Cai, H. Fang, and Y. Yu (2016), "Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1:

- characterization and genome functional analysis", *Scientific Reports*, 6(1), pp. 21332.
85. Peng L., D. Deng, M. Guan, X. Fang, and Q. Zhu (2015), "Remediation HCHs POPs-contaminated soil by activated persulfate technologies: Feasibility, impact of activation methods and mechanistic implications", *Separation and Purification Technology*, 150, pp. 215-222.
 86. Pesce S.F., J. Cazenave, M.V. Monferrán, S. Frede, and D.A. Wunderlin (2008), "Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*", *Environmental Pollution*, 156(3), pp. 775-783.
 87. Pesce S.F. and D.A. Wunderlin (2004), "Biodegradation of lindane by a native bacterial consortium isolated from contaminated river sediment", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(4), pp. 255-260.
 88. Phillips T.M., A.G. Seech, H. Lee, and J.T. Trevors (2005), "Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms", *Biodegradation*, 16(4), pp. 363-392.
 89. Pino N.J., M.C. Dominguez, and G.A. Penuela (2011), "Isolation of a selected microbial consortium capable of degrading methyl parathion and p-nitrophenol from a contaminated soil site", *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(2), pp. 173-180.
 90. Prabakaran G. and S. Hoti (2008), "Application of different downstream processing methods and their comparison for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis after fermentation for mosquito control", *Biologicals*, 36(6), pp. 412-415.
 91. Purnomo A.S., F. Koyama, T. Mori, and R. Kondo (2010), "DDT degradation potential of cattle manure compost", *Chemosphere*, 80(6), pp. 619-624.
 92. Quintero J., M. Moreira, J. Lema, and G. Feijoo (2006), "An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry", *Chemosphere*, 63(6), pp. 1005-1013.

93. Rangachary L., R.P. Rajagopalan, T.M. Singh, and M.H. Krishnan (2012), "Purification and characterization of DDT-dehydrohalogenase from *Pseudomonas putida* T5", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(1), pp. 60-76.
94. Reedich L.M., M.D. Millican, and P.L. Koch (2017), "Temperature impacts on soil microbial communities and potential implications for the biodegradation of turfgrass pesticides", *Journal of Environmental Quality*, 46(3), pp. 490-497.
95. Rodríguez-Vázquez R. and D. Acosta-Ramírez (2013), "Regeneration of DDT contaminated soils by co-composting". in *II International Symposium on Organic Matter Management and Compost Use in Horticulture 1076*.
96. Saad M.M., A.A. Eida, and H. Hirt (2020), "Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application", *Journal of Experimental Botany*, 71(13), pp. 3878-3901.
97. Saez J.M., A. Álvarez, C.S. Benimeli, and M.J. Amoroso (2014), "Enhanced lindane removal from soil slurry by immobilized *Streptomyces* consortium", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, pp. 63-69.
98. Sáez J.M., A. Alvarez, M.S. Fuentes, M. Amoroso, and C.S. Benimeli (2016), "An overview on microbial degradation of lindane", *Microbe-induced Degradation of Pesticides*, pp. 191-212.
99. Saez J.M., J.D. Aparicio, M.J. Amoroso, and C.S. Benimeli (2015), "Effect of the acclimation of a *Streptomyces* consortium on lindane biodegradation by free and immobilized cells", *Process Biochemistry*, 50(11), pp. 1923-1933.
100. Sasek V., J.A. Glaser, and P. Baveye (2003), *The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solutions*, Vol. 19. Springer Science & Business Media.
101. Sayara T. and A. Sánchez (2020), "Bioremediation of PAH-contaminated soils: process enhancement through composting/compost", *Applied Sciences*, 10(11), pp. 3684.

102. Sharma P., V. Raina, R. Kumari, S. Malhotra, C. Dogra, H. Kumari, H.-P.E. Kohler, H.-R. Buser, C. Holliger, and R. Lal (2006), "Haloalkane dehalogenase LinB is responsible for β - and δ -hexachlorocyclohexane transformation in *Sphingobium indicum* B90A", *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), pp. 5720-5727.
103. Sharma S.K., K. Sadasivam, and J. Dave (1987), "DDT degradation by bacteria from activated sludge", *Environment International*, 13(2), pp. 183-190.
104. Silby M.W., C. Winstanley, S.A. Godfrey, S.B. Levy, and R.W. Jackson (2011), "*Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable", *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), pp. 652-680.
105. Sineli P.E., G. Tortella, J.S. Dávila Costa, C.S. Benimeli, and S.A. Cuozzo (2016), "Evidence of α -, β - and γ -HCH mixture aerobic degradation by the native actinobacteria *Streptomyces* sp. M7", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(5), pp. 81.
106. Sudharshan S., R. Naidu, M. Mallavarapu, and N. Bolan (2012), "DDT remediation in contaminated soils: a review of recent studies", *Biodegradation*, 23(6), pp. 851-863.
107. Tawfeeq H.R., S.S. Al-Jubori, and A.H. Mussa (2024), "Purification and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase (EC 1.13. 11.1; catechol-oxygen 1, 2-oxidoreductase; C12O) using the local isolate of phenol-degrading *Pseudomonas putida*", *Folia Microbiologica*, 69(3), pp. 579-593.
108. Tran T.D., N.T. Dao, R. Sasaki, M.B. Tu, G.H.M. Dang, H.G. Nguyen, H.M. Dang, C.H. Vo, Y. Inigaki, and N. Van Nguyen (2020), "Accelerated remediation of organochlorine pesticide-contaminated soils with phyto-Fenton approach: a field study", *Environmental Geochemistry and Health*, 42(11), pp. 3597-3608.

109. Turusov V., V. Rakitsky, and L. Tomatis (2002), "Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks", *Environmental Health Perspectives*, 110(2), pp. 125-128.
110. Tzintzun-Camacho O., O. Loera, H.C. Ramírez-Saad, and M. Gutiérrez-Rojas (2012), "Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70, pp. 1-7.
111. Usmani Z., M. Kulp, and T. Lukk (2021), "Bioremediation of lindane contaminated soil: Exploring the potential of actinobacterial strains", *Chemosphere*, 278, pp. 130468.
112. Van Den Berg H., G. Manuweera, and F. Konradsen (2017), "Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases", *Malaria Journal*, 16(1), pp. 401.
113. Vijgen J., P. Abhilash, Y.F. Li, R. Lal, M. Forter, J. Torres, N. Singh, M. Yunus, C. Tian, and A. Schäffer (2011), "Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers", *Environmental Science and Pollution Research*, 18(2), pp. 152-162.
114. Vijgen J., B. De Borst, R. Weber, T. Stobiecki, and M. Forter (2019), "HCH and lindane contaminated sites: European and global need for a permanent solution for a long-time neglected issue", *Environmental Pollution*, 248, pp. 696-705.
115. Vu S.T, T.T.Q.Trang, N. T. H. Yen, L. H, Anh, N. H. Dang, L. T. Dong, V. H. Phuong, T. T. T. Huyen, N.K.N. Thao, P.T. Hai, (Accepted 2022), "Collection of DDT-degrading bacterial strains in northern VietNam, toward the bioremediation of contaminated agricultural soil", *Vietnam Journal of Science and Technology*
116. Wang B., W. Liu, X. Liu, A.E. Franks, Y. Teng, and Y. Luo (2017), "Comparative analysis of microbial communities during enrichment and

- isolation of DDT-degrading bacteria by culture-dependent and-independent methods", *Science of the Total Environment*, 590, pp. 297-303.
117. Wang J., D. Yan, R. Dixon, and Y.-P. Wang (2016), "Deciphering the principles of bacterial nitrogen dietary preferences: a strategy for nutrient containment", *MBio*, 7(4), pp. 10.1128/mbio.00792-16.
 118. Wang X., B.T. Oba, H. Wang, Q. Luo, J. Liu, L. Tang, M. Yang, H. Wu, and L. Sun (2023), "Degradation of DDT by a novel bacterium, *Arthrobacter globiformis* DC-1: efficacy, mechanism and comparative advantage", *Water*, 15(15), pp. 2723.
 119. Wang X., L. Sun, H. Wang, H. Wu, S. Chen, and X. Zheng (2018), "Surfactant-enhanced bioremediation of DDTs and PAHs in contaminated farmland soil", *Environmental Technology*, 39(13), pp. 1733-1744.
 120. Wang X., K. Xia, X. Yang, and C. Tang (2019), "Growth strategy of microbes on mixed carbon sources", *Nature Communications*, 10(1), pp. 1279.
 121. Whitney C. (2012), "The silent decade: Why it took ten years to ban DDT in the United States".
 122. Wishart D.S., C. Li, A. Marcu, H. Badran, A. Pon, Z. Budinski, J. Patron, D. Lipton, X. Cao, and E. Oler (2020), "PathBank: a comprehensive pathway database for model organisms", *Nucleic Acids Research*, 48(D1), pp. D470-D478.
 123. Wooltorton E. (2003), "Concerns over lindane treatment for scabies and lice", *Cmaj*, 168(11), pp. 1447-1448.
 124. Xiao P., T. Mori, I. Kamei, and R. Kondo (2011), "A novel metabolic pathway for biodegradation of DDT by the white rot fungi, *Phlebia lindtneri* and *Phlebia brevispora*", *Biodegradation*, 22(5), pp. 859-867.
 125. Xie H., L. Zhu, J. Wang, J. Jiang, and J. Wang (2017), "Biodegradation of DDE and DDT by bacterial strain *Stenotrophomonas* sp. DXZ9", *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 7(496), pp. 2161-0525.1000496.

126. Xu H.-J., J. Bai, W. Li, J.C. Murrell, Y. Zhang, J. Wang, C. Luo, and Y. Li (2021), "Mechanisms of the enhanced DDT removal from soils by earthworms: identification of DDT degraders in drilosphere and non-drilosphere matrices", *Journal of Hazardous Materials*, 404, pp. 124006.
127. Yuechun Z., Y. Xiaoyun, L. Minghua, L. Lu, and M. Weijuan (2010), "Biodegradation kinetics of DDT in soil under different environmental conditions by laccase extract from white rot fungi", *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18(3), pp. 486-492.
128. Yusoff S., A. Kamari, and N. Aljafree (2016), "A review of materials used as carrier agents in pesticide formulations", *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(12), pp. 2977-2994.
129. Zea M., A. Souza, Y. Yang, L. Lee, K. Nemali, and L. Hoagland (2022), "Leveraging high-throughput hyperspectral imaging technology to detect cadmium stress in two leafy green crops and accelerate soil remediation efforts", *Environmental Pollution*, 292, pp. 118405.
130. Zhang H., H. Wan, L. Song, H. Jiang, H. Wang, and C. Qiao (2010), "Development of an autofluorescent *Pseudomonas nitroreducens* with dehydrochlorinase activity for efficient mineralization of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH)", *Journal of Biotechnology*, 146(3), pp. 114-119.
131. Zhang S., T. Jiao, Y. Chen, N. Gao, L. Zhang, and M. Jiang (2014), "Methylglyoxal induces systemic symptoms of irritable bowel syndrome", *PloS One*, 9(8), pp. e105307.
132. Zhang W., Z. Lin, S. Pang, P. Bhatt, and S. Chen (2020), "Insights into the biodegradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) using a microbial system", *Frontiers In Microbiology*, 11, pp. 522.
133. Zheng G., A. Selvam, and J.W. Wong (2011), "Rapid degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) at low temperature by *Sphingobium* strains", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(4), pp. 612-618.

134. Ziemert N., M. Alanjary, and T. Weber (2016), "The evolution of genome mining in microbes—a review", *Natural Product Reports*, 33(8), pp. 988-1005.
135. A. L.L., Y.L. D. Wei, and H. Lei (2011), *Computational methods for identification of novel secondary metabolite biosynthetic pathways by genome analysis*, in *Handbook of Research on Computational and Systems Biology: Interdisciplinary Applications*, IGI Global. p. 776.
136. Bolger A.M., M. Lohse, and B.J.B. Usadel (2014), "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data", 30(15), pp. 2114-2120.
137. Feng G., T. Xie, X. Wang, J. Bai, L. Tang, H. Zhao, W. Wei, M. Wang, and Y. Zhao (2018), "Metagenomic analysis of microbial community and function involved in cd-contaminated soil", *BMC microbiology*, 18(1), pp. 11.
138. Guillén-Jiménez F.D.M., E. Cristiani-Urbina, J.C. Cancino-Díaz, J.L. Flores-Moreno, and B.E. Barragán-Huerta (2012), "Lindane biodegradation by the *Fusarium verticillioides* AT-100 strain, isolated from *Agave tequilana* leaves: kinetic study and identification of metabolites", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, pp. 36-47.
139. Gurevich A., V. Saveliev, N. Vyahhi, and G.J.B. Tesler (2013), "QUAST: quality assessment tool for genome assemblies", 29(8), pp. 1072-1075.
140. Huang Y., L. Li, X. Yin, and T. Zhang (2023), "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation capacity revealed by a genome-function relationship approach", *Environmental microbiome*, 18(1), pp. 39.
141. Jaiswal S., D.K. Singh, and P. Shukla (2022), "Lindane bioremediation by *Paenibacillus dendritiformis* SJPS-4, its metabolic pathway analysis and functional gene annotation", *Environmental Technology & Innovation*, 27, pp. 102433.
142. Kajitani R., K. Toshimoto, H. Noguchi, A. Toyoda, Y. Ogura, M. Okuno, M. Yabana, M. Harada, E. Nagayasu, and H.J.G.R. Maruyama (2014), "Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads", 24(8), pp. 1384-1395.

143. Kanehisa M., Y. Sato, and M.J.P.S. Kawashima (2022), "KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data", 31(1), pp. 47-53.
144. Manickam N., R. Misra, and S. Mayilraj (2007), "A novel pathway for the biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp. strain ICH12", *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), pp. 1468-1478.
145. Manickam N., M. Reddy, H. Saini, and R. Shanker (2008), "Isolation of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* sp. by dehalogenase assay and characterization of genes involved in γ -HCH degradation", *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), pp. 952-960.
146. Pant G., S.K. Mistry, and G. Sibi (2013), "Isolation, identification and characterization of p, p'-DDT degrading bacteria from soil", *Journal of Environmental Science and Technology*, 6(3), pp. 130-137.
147. Simão F.A., R.M. Waterhouse, P. Ioannidis, E.V. Kriventseva, and E.M.J.B. Zdobnov (2015), "BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs", 31(19), pp. 3210-3212.
148. Smith R. (1992), "Legume inoculant formulation and application", *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), pp. 485-492.
149. Tran Vu H.A., H.L. Phan Van, N. Nguyen Thi, C.N. Ho Thi, and A.D. Do (2026), "Whole-genome sequencing and functional validation of the plant growth-promoting *Bacillus velezensis* DO23 isolated in Vietnam", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 42(6), pp. 310.
150. Vu T.H.N., N.T. Quach, N.A. Nguyen, H.T. Nguyen, C.C. Ngo, T.D. Nguyen, P.-H. Ho, H. Hoang, H.H. Chu, and Q.-T. Phi (2021), "Genome mining associated with analysis of structure, antioxidant activity reveals the potential production of levan-rich exopolysaccharides by food-derived *Bacillus velezensis* VTX20", *Applied Sciences*, 11(15), pp. 7055.
151. Wang W., Q. Li, L. Zhang, J. Cui, H. Yu, X. Wang, X. Ouyang, F. Tao, P. Xu, and H. Tang (2021), "Genetic mapping of highly versatile and solvent-tolerant *Pseudomonas putida* B6-2 (ATCC BAA-2545) as a 'superstar' for

mineralization of PAHs and dioxin-like compounds", *Environmental microbiology*, 23(8), pp. 4309-4325.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Cơ sở dữ liệu (CSDL) của các nguồn gen:

Các cơ sở dữ liệu trên được công bố online tại đường link:
<https://sites.google.com/view/phamgroup/project-data?authuser=0>

Toàn bộ trình tự hệ gen của các chủng đã được gửi lưu trữ trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) với các mã truy cập tương ứng như sau: SRX21629081 cho *Pseudomonas* sp. nov. T006, SRX21629080 cho *Pseudomonas putida* T087, SRX21629073 cho *Cupriavidus metallidurans* TN030, SRX21629083 cho *Pseudomonas lalkuanensis* PAM64, SRX21629082 cho *Pseudomonas anuradhapurensis* PAM67, SRX21629079 cho *Pseudomonas nitroreducens* Y077, SRX21629087 cho *Stenotrophomonas maltophilia* Y042, SRX21629086 cho *Stenotrophomonas maltophilia* Y050, SRX21629091 cho *Streptomyces marianii* DDT21, SRX21629090 cho *Streptomycesnojiriensis* DDT23, SRX21629085 cho *Sphingobacterium mizutaii* Y027, SRX21629084 cho *Sphingobacterium multivorum* Y049, SRX21629077 cho *Pseudomonas putida* PAM65, SRX21629076 cho *Pseudomonas putida* PAM66, SRX2162907 cho *Pseudomonas kribbensis* Y076, SRX21629078 cho *Pseudomonas putida* T069, SRX21629088 cho *Streptomyces wuyurensis* LD02, SRX21629089 cho *Streptomyces katrae* A119 và SRX21629074 cho *Sphingobacterium multivorum* Y052.

Phụ lục 2. Kết quả phân loại sơ bộ dựa trên dữ liệu gốc sử dụng công cụ Kraken2

STT	Mẫu	Chi chiếm tỉ lệ lớn nhất (%)	Chi chiếm tỉ lệ lớn thứ 2 (%)	Chi chiếm tỉ lệ lớn thứ 3 (%)	Tỷ lệ chưa xác định được (%)
1	PAM64	<i>Pseudomonas</i> (51,76)	<i>Azotobacter</i> (0,12)	<i>Burkholderia</i> (0,06)	45,37
2	PAM67	<i>Pseudomonas</i> (72,47)	<i>Enterobacter</i> (0,05)	<i>Burkholderia</i> (0,03)	25,71
3	Y042	<i>Stenotrophomonas</i> (94,6)	<i>Xanthomonas</i> (0,17)	<i>Pseudomonas</i> (0,02)	4,65
4	Y077	<i>Pseudomonas</i> (44,3)	<i>Achromobacter</i> (6,43)	<i>Bordetella</i> (0,17)	45,48
5	T006	<i>Pseudomonas</i> (51,68)	<i>Azotobacter</i> (0,13)	<i>Burkholderia</i> (0,09)	44,85
6	T087	<i>Pseudomonas</i> (88,58)	<i>Streptomyces</i> (0,03)	<i>Xanthomonas</i> (0,01)	10,81
7	DDT21	<i>Streptomyces</i> (67,28)	<i>Amycolatopsis</i> (0,06)	<i>Kitasatospora</i> (0,05)	31,17
8	DDT23	<i>Streptomyces</i> (64,46)	<i>Kitasatospora</i> (0,17)	<i>Streptacidiphilus</i> (0,02)	33,27
9	TN030	<i>Cupriavidus</i> (95,7)	<i>Ochrobactrum</i> (0,15)	<i>Brucella</i> (0,02)	0,51
10	T069	<i>Pseudomonas</i> (69,08)	<i>Staphylococcus</i> (0,33)	<i>Burkholderia</i> (0,05)	27,41
11	A119	<i>Streptomyces</i> (64,67)	<i>Staphylococcus</i> (0,2)	<i>Kitasatospora</i> (0,13)	32,13
12	PAM65	<i>Pseudomonas</i> (90,66)	<i>Stenotrophomonas</i> (0,01)	<i>Cupriavidus</i> (0,01)	8,55
13	PAM66	<i>Pseudomonas</i> (90,65)	<i>Stenotrophomonas</i> (0,02)	<i>Burkholderia</i> (0,02)	8,74
14	Y027	<i>Sphingobacterium</i> (40,88)	<i>Brucella</i> (22,26)	<i>Microbacterium</i> (3,64)	29,8
15	Y076	<i>Pseudomonas</i> (78,79)	<i>Streptomyces</i> (0,09)	<i>Klebsiella</i> (0,05)	20,53
16	Y049	<i>Sphingobacterium</i> (58,38%)	<i>Pseudopedobacter</i> (0,03%)	<i>Pedobacter</i> (0,03%)	38,73

STT	Mẫu	Chi chiếm tỉ lệ lớn nhất (%)	Chi chiếm tỉ lệ lớn thứ 2 (%)	Chi chiếm tỉ lệ lớn thứ 3 (%)	Tỷ lệ chưa xác định được (%)
17	Y052	<i>Sphingobacterium</i> (57,94%)	<i>Pedobacter</i> (0,03%)	<i>Pseudopedobacter</i> (0,02%)	36,88
18	Y050	<i>Stenotrophomonas</i> (95,72)	<i>Xanthomonas</i> (0,16)	<i>Pseudoxanthomonas</i>	3,85
19	LD02	<i>Streptomyces</i> (58,3)	<i>Kitasatospora</i> (0,09)	<i>Rhodococcus</i> (0,04)	39,32

Phụ lục 3. Thống kê các số lượng enzyme có trong các con đường trao đổi chất chính của các chủng tuyển chọn phân giải DDT chủ giải theo CSDL KEGG.

Mã số	Tên con đường	DDT21	DDT23	PAM64	PAM67	T006	T087	TN030	Y042	Y050	Y077
Global and overview maps											
01100	Metabolic pathways	848	711	793	770	792	758	769	573	583	792
01110	Biosynthesis of secondary metabolites	341	329	285	291	279	287	298	247	253	291
01120	Microbial metabolism in diverse environments	257	206	245	216	244	216	249	136	137	237
01200	Carbon metabolism	101	81	96	88	89	90	102	80	81	91
01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	24	26	26	24	23	23	24	20	18	23
01212	Fatty acid metabolism	22	18	28	21	26	21	23	21	22	27
01230	Biosynthesis of amino acids	106	104	106	104	101	104	103	95	93	102
01232	Nucleotide metabolism	46	46	40	37	40	36	37	35	40	39
01250	Biosynthesis of nucleotide sugars	36	31	41	41	39	36	34	30	32	35

Mã số	Tên con đường	DDT21	DDT23	PAM64	PAM67	T006	T087	TN030	Y042	Y050	Y077
01240	Biosynthesis of cofactors	144	133	141	140	141	141	131	111	105	142
01220	Degradation of aromatic compounds	26	12	28	20	28	22	23	3	2	20
Xenobiotics biodegradation and metabolism											
00362	Benzoate degradation	17	9	27	22	27	23	23	5	5	24
00627	Aminobenzoate degradation	13	8	9	4	7	3	13	1	1	7
00364	Fluorobenzoate degradation	4	1	6	6	7	6	7	1	1	6
00625	Chloroalkane and chloroalkene degradation	8	4	7	5	5	6	5	3	3	6
00361	Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	5	1	3	2	3	2	6	1	2	3
00623	Toluene degradation	2	2	2	2	3	2	3	1	1	3
00622	Xylene degradation	3	1	8	5	9	6	8	0	0	5
00633	Nitrotoluene degradation	1	3	1	2	1	2	4	1	1	3
00642	Ethylbenzene degradation	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
00643	Styrene degradation	5	4	8	8	8	7	4	4	3	8
00791	Atrazine degradation	7	4	6	3	6	4	3	0	0	6
00930	Caprolactam degradation	5	5	5	2	6	2	4	1	1	6
00621	Dioxin degradation	3	0	4	1	4	1	4	0	0	2
00626	Naphthalene degradation	4	3	3	2	2	3	2	2	2	3
00624	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	2	0	2	2	2	2	2	0	0	2
00984	Steroid degradation	7	4	7	1	1	1	3	0	1	2
00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	6	2	4	3	3	3	3	3	3	3
00982	Drug metabolism - cytochrome P450	6	3	5	4	4	4	3	3	3	4

Mã số	Tên con đường	DDT21	DDT23	PAM64	PAM67	T006	T087	TN030	Y042	Y050	Y077
00983	Drug metabolism - other enzymes	13	14	9	10	9	10	9	8	10	10

Phụ lục 4. Kết quả phân tích các enzyme trong một số con đường cụ thể liên quan đến phân giải DDT (và Lindane) của các chủng tuyển chọn phân giải DDT, dựa trên phân tích genome bằng KEGG

K number	Enzyme	DDT21	DDT23	PAM64	PAM67	T006	T087	TN030	Y042	Y050	Y077
<i>Phân giải Lindane (00361 Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation)</i>											
K01061	carboxymethylenebutenolidase	X	X			X		X	X	X	X
K01560	2-haloacid dehalogenase	X						X			
K01561	haloacetate dehalogenase	X						X			
K01563	haloalkane dehalogenase									X	
K01856	muconate cyclohexadienylisomerase			X	X	X	X	X			X
K03381	catechol 1,2-dioxygenase	X		X	X	X	X	X			X
K21607	tetrachlorobenzoquinone reductase	X		X				X			
<i>Phân giải DDT (00621 Dioxin degradation)</i>											
K01666	4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase	X		X		X		X			
K01821	4-oxalocrotonate tautomerase			X	X	X	X	X			X
K02554	2-keto-4-pentenoate hydratase	X		X		X		X			X
K04073	acetaldehyde dehydrogenase	X		X		X		X			

Phụ lục 5. Thống kê các số lượng enzyme có trong các con đường trao đổi chất chính của các chủng tuyển chọn phân giải Lindane chú giải theo CSDL KEGG

Mã số	Tên con đường	A119	LD02	T069	PAM65	PAM66	Y076	Y027	Y049	Y052	Y050
Global and overview maps											
01100	Metabolic pathways	732	765	853	772	782	791	528	577	555	583
01110	Biosynthesis of secondary metabolites	328	328	315	288	290	300	245	272	266	253
01120	Microbial metabolism in diverse environments	217	225	259	227	230	225	134	152	145	137
01200	Carbon metabolism	91	95	100	89	90	89	68	85	80	81
01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	36	35	35	31	31	33	25	26	26	26
01212	Fatty acid metabolism	24	23	28	21	21	22	20	19	18	22
01230	Biosynthesis of amino acids	98	102	109	103	104	105	94	103	102	93
01232	Nucleotide metabolism	48	45	38	38	38	41	32	31	31	40
01250	Biosynthesis of nucleotide sugars	30	35	40	38	37	44	30	37	36	32
01240	Biosynthesis of cofactors	137	132	148	140	143	142	106	113	106	105
01220	Degradation of aromatic compounds	11	14	29	25	27	20	3	5	5	2
Xenobiotics biodegradation and metabolism											
00362	Benzoate degradation	8	10	27	24	28	7	23	5	5	5
00627	Aminobenzoate degradation	9	10	9	5	5	3	5	2	2	1
00364	Fluorobenzoate degradation	1	2	7	6	6	0	6	0	0	1

Mã số	Tên con đường	A119	LD02	T069	PAM65	PAM66	Y076	Y027	Y049	Y052	Y050
00625	Chloroalkane and chloroalkene degradation	4	5	4	6	6	2	7	4	4	3
00361	Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	2	0	4	2	2	0	4	0	0	2
00623	Toluene degradation	1	0	3	2	2	0	2	0	0	1
00622	Xylene degradation	0	0	8	8	10	0	5	0	0	0
00633	Nitrotoluene degradation	3	3	0	2	2	1	1	1	1	1
00642	Ethylbenzene degradation	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
00643	Styrene degradation	3	5	8	7	7	1	8	0	1	3
00791	Atrazine degradation	4	7	6	4	4	3	6	4	4	0
00930	Caprolactam degradation	4	2	5	3	3	4	5	3	3	1
00621	Dioxin degradation	0	0	4	3	4	0	1	0	0	0
00626	Naphthalene degradation	2	3	2	3	3	0	3	3	3	2
00624	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0
00984	Steroid degradation	6	5	8	1	1	1	2	0	0	1
00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	2	4	3	3	3	0	3	3	2	3
00982	Drug metabolism - cytochrome P450	3	5	3	4	4	1	4	3	2	3
00983	Drug metabolism - other enzymes	13	12	10	10	10	9	10	11	10	10

Phụ lục 6. Kết quả phân tích các enzyme trong một số con đường cụ thể liên quan đến phân giải DDT (và Lindane) của các chủng tuyển chọn phân giải Lindane, dựa trên phân tích genome bằng KEGG

K number	Enzyme	A119	LD02	T069	PAM65	PAM66	Y076	Y027	Y049	Y052	Y050
<i>Phân giải Lindane (00361 Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation)</i>											
K01061	Carboxymethylenebutenolidase	X		X							X
K01560	2-haloacid dehalogenase						X				
K01561	haloacetate dehalogenase						X				
K01563	haloalkane dehalogenase	X									X
K01856	muconate cyclochlorideisomerase			X	X	X	X				
K03381	catechol 1,2-dioxygenase			X	X	X	X				
K21607	tetrachlorobenzoquinone reductase			X							
<i>Phân giải DDT (00621 Dioxin degradation)</i>											
K01666	4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase			X	X	X					
K01821	4-oxalocrotonate tautomerase			X	X	X	X				
K02554	2-keto-4-pentenoate hydratase			X		X					
K04073	acetaldehyde dehydrogenase			X	X	X					

Phụ lục 7. Hoạt tính sinh enzyme oxy hóa, hoạt tính loại chloride và khả năng sinh biosurfactant

Ghi chú: Không có hoạt tính (-); Hoạt tính yếu (+); Hoạt tính khá mạnh (++) ; Hoạt tính mạnh (+++) ; Hoạt tính rất mạnh (++++)

	Hoạt tính sinh enzyme oxy hóa	Hoạt tính loại chloride	Khả năng sinh biosurfactants
DDT21	-	++	+
DDT23	-	++	+
PAM64	++++	++	+
PAM67	++++	+++	+
T006	++++	++	+
T087	++++	++	+
TN030	+	+	+
Y042	++++	+	+
Y050	+++	++	+
Y077	++++	+++	+
Y027	+	++++	++++
Y049	+	+	+++
PAM65	+	+	++++
PAM66	+	+	++++
Y076	+	++++	+++
T069	+	++++	+
LD02	-	-	++
A119	-	-	++
Y050	+	++	++++
Y052	+	+	+

Phụ lục 8. Kết quả thử nghiệm khả năng đối kháng giữa các chủng phân giải hiệu quả DDT tuyển chọn được trong điều kiện hiếu khí.

(Trong điều kiện kỵ khí, các chủng đều không đối kháng nhau).

Ghi chú: hàng ngang: các chủng được thử tính đối kháng (thỏi thạch); cột dọc: các chủng được thử khả năng bị đối kháng (cây trái). -: không đối kháng; số ở trong ô (nếu có): đường kính vòng kháng (mm).

	T006	T087	TN030	Y042	Y050	Y077	PAM64	PAM67	DDT21	DDT23
T006		-	-	-	-	-	-	-	-	-
T087	-		-	-	-	-	-	-	-	-
TN030	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Y042	-	-	-		-	-	-	-	-	-
Y050	-	-	-	-		-	-	-	-	-
Y077	-	-	-	-	-		-	-	-	-
PAM 64	-	-	-	-	-	-		-	-	-
PAM 67	-	-	-	-	-	-	-		-	-
DDT 21	-	-	-	-	-	-	-	-		13
DDT 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Phụ lục 9. Kết quả thử nghiệm khả năng đối kháng giữa các chủng phân giải hiệu quả Lindane tuyển chọn được trong điều kiện hiếu khí

(Trong điều kiện kỵ khí, các chủng đều không đối kháng nhau).

Ghi chú: hàng ngang: các chủng được thử tính đối kháng (thỏi thạch); cột dọc: các chủng được thử khả năng bị đối kháng (cây trái). -: không đối kháng; số ở trong ô (nếu có): đường kính vòng kháng (mm).

	LD02	A119	T069	T086	Y027	Y049	Y050	Y052	Y076	PAM ₆₅	PAM ₆₆
LD02		-	-	-	-	-	-	-	8	+	+
A119	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-
T069	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
T086	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Y027	-	-	-	-		-	-	-	+	-	-
Y049	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
Y050	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
Y052	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Y076	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
PAM₆₅	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
PAM₆₆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Phụ lục 10. Dữ liệu thô của thí nghiệm đánh giá hiệu suất phân giải DDT của các chủng vi khuẩn tổ hợp, so sánh với hiệu suất phân giải DDT của các chủng vi khuẩn đơn lẻ.

Ghi chú: Nồng độ DDT trong mỗi mẫu được xác định bằng đường chuẩn đã thiết lập tại mỗi thời điểm đo. Hiệu suất phân giải lý thuyết của tổ hợp được tính bằng hiệu suất phân giải trung bình của các chủng vi khuẩn đơn lẻ trong tổ hợp. Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất = Hiệu suất phân giải thực tế - Hiệu suất phân giải lý thuyết.

<i>1 tuần – Môi trường lỏng</i>											
	Peak area			Nồng độ DDT (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HD1	22.61	21.13		28.19	26.30		3.32%	6.34%	4.59%	3.02%	0.139%
HD2	20.88	20.90		25.98	26.01		3.31%	10.64%	0.08%	7.33%	0.006%
HD3	21.78	21.69		27.14	27.02		3.22%	6.91%	0.28%	3.69%	0.010%
HD4	21.77	21.60		27.12	26.91		3.21%	7.12%	0.53%	3.92%	0.021%
HD5	21.38	21.93		26.62	27.33		2.27%	7.28%	1.73%	5.01%	0.087%
HD6	23.25	19.05	21.92	29.00	23.65	27.31	2.25%	8.36%	9.40%	6.11%	0.574%
HD7	22.03	21.67		27.45	27.00		2.14%	6.41%	1.10%	4.27%	0.047%
HD8	25.03	23.41	23.63	31.28	29.21	29.49	2.13%	-3.11%	3.86%	-5.24%	0.202%
HD9	21.03	25.32	22.49	26.17	31.65	28.04	1.77%	1.61%	9.57%	-0.16%	0.015%
HD10	23.35	18.84	20.47	29.13	23.38	25.46	1.60%	10.65%	10.01%	9.06%	0.907%
DDT21	22.81	23.00		28.45	28.69			1.78%	0.59%		
PAM64	22.26	22.65		27.75	28.24			3.76%	1.20%		
PAM67	22.17	22.76		27.63	28.39			3.71%	1.84%		
T006	22.53	22.31		28.09	27.81			3.92%	0.69%		

TN030	24.40	22.41		30.47	27.93			-0.39%	6.18%		
Y042	22.82	20.37		28.46	25.34			7.53%	7.58%		
Y077	22.12	22.95		27.57	28.63			3.41%	2.58%		
2 tuần – Môi trường lỏng											
	Peak area			Nồng độ DDT (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HD1	17.32	18.45		23.17	24.68		9.67%	20.29%	3.56%	10.62%	0.378%
HD2	18.25	17.83		24.41	23.84		9.16%	19.62%	1.35%	10.46%	0.141%
HD3	18.97	17.97		25.37	24.04		9.04%	17.69%	3.14%	8.65%	0.272%
HD4	19.76	19.56		26.42	26.15		8.53%	12.40%	0.64%	3.87%	0.025%
HD5	19.11	19.25		25.55	25.75		9.64%	14.53%	0.45%	4.89%	0.022%
HD6	19.04	19.06		25.46	25.49		9.00%	15.11%	0.09%	6.11%	0.006%
HD7	20.61	20.30		27.56	27.15		8.85%	8.86%	0.96%	0.01%	0.000%
HD8	20.37	16.34	16.88	27.24	21.85	22.57	8.22%	20.41%	9.75%	12.20%	1.189%
HD9	19.45	19.47		26.01	26.04		9.36%	13.28%	0.06%	3.92%	0.002%
HD10	19.63	16.87	17.82	26.24	22.57	23.83	8.31%	19.31%	6.23%	11.00%	0.685%
DDT21	21.65	20.30		28.96	27.14			6.54%	4.28%		
PAM64	19.89	20.29		26.60	27.14			10.47%	1.27%		
PAM67	21.17	20.16		28.31	26.96			7.93%	3.18%		
T006	20.51	18.60		27.42	24.87			12.88%	6.02%		
TN030	20.81	20.19		27.82	27.00			8.66%	1.93%		
Y042	20.21	20.29		27.03	27.13			9.78%	0.23%		
Y077	19.94	20.58		26.66	27.52			9.73%	2.01%		
1 tuần – Môi trường bán rắn											
	Peak area			Nồng độ DDT (ppm) theo đường chuẩn					SD		SD

	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế		Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	
HD1	3.91	3.94		16.32	16.47		21.25%	44.81%	0.36%	23.56%	0.084%
HD2	3.56	5.21	4.47	14.86	21.87	18.72	22.06%	37.79%	11.82%	15.72%	1.858%
HD3	4.42	4.03		18.52	16.84		18.05%	40.50%	3.99%	22.45%	0.895%
HD4	2.82	3.38		11.70	14.09		18.87%	56.60%	5.70%	37.73%	2.151%
HD5	4.78	3.66		20.02	15.29		23.83%	40.58%	11.27%	16.75%	1.888%
HD6	3.11	5.52	4.41	12.97	23.16	18.46	24.85%	38.76%	17.17%	13.92%	2.390%
HD7	3.26	3.95		13.59	16.52		19.84%	49.32%	6.97%	29.48%	2.055%
HD8	4.34	4.22		18.15	17.66		20.85%	39.75%	1.17%	18.89%	0.221%
HD9	4.50	3.86		18.87	16.15		24.24%	41.07%	6.46%	16.83%	1.088%
HD10	5.37	2.97	2.02	22.55	12.35	8.32	18.92%	51.50%	24.68%	32.59%	8.041%
DDT21	5.58	5.96		23.43	25.06			18.39%	3.87%		
PAM64	4.73	6.22		19.84	26.17			22.59%	15.06%		
PAM67	4.77	5.62		19.99	23.59			26.66%	8.56%		
T006	5.33	4.93		22.37	20.65			27.61%	4.08%		
TN030	5.50	4.88		23.08	20.46			26.73%	6.23%		
Y042	5.40	7.19		22.68	30.25			10.92%	18.01%		
Y077	7.09	5.40		29.84	22.67			11.64%	17.05%		
2 tuần – Môi trường bán rắn											
	Peak area			Nồng độ DDT (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HD1	2.54	1.90	1.93	11.67	8.55	8.71	21.14%	66.63%	6.08%	45.49%	2.766%
HD2	2.78	2.31		12.87	10.59		30.95%	59.43%	5.59%	28.48%	1.591%
HD3	1.83	2.70		8.23	12.47		18.99%	64.19%	10.36%	45.20%	4.684%

HD4	1.80	2.58	1.96	8.06	11.91	8.83	28.80%	66.79%	7.03%	38.00%	2.672%
HD5	2.32	2.62		10.63	12.06		21.09%	60.76%	3.51%	39.68%	1.392%
HD6	3.33	3.28		15.56	15.29		33.35%	46.64%	0.65%	13.29%	0.087%
HD7	2.45	2.48		11.23	11.40		18.39%	60.87%	0.41%	42.48%	0.172%
HD8	2.64	3.25		12.19	15.15		30.65%	52.72%	7.24%	22.07%	1.599%
HD9	2.77	3.31		12.84	15.43		29.81%	51.10%	6.35%	21.30%	1.353%
HD10	3.73	2.99		17.52	13.91		26.22%	45.64%	8.82%	19.42%	1.712%
DDT21	4.66	5.53		22.05	26.33			16.34%	10.47%		
PAM64	5.91	6.80		28.19	32.57			-5.09%	10.71%		
PAM67	3.16	3.76		14.73	17.68			43.96%	7.21%		
T006	3.59	3.42		16.81	16.00			43.25%	1.98%		
TN030	4.55	4.04		21.53	19.03			29.84%	6.12%		
Y042	4.56	5.90	3.93	21.58	28.13	18.49		21.37%	17.02%		
Y077	5.11	3.17		24.28	14.76			32.47%	23.28%		
1 tuần – môi trường rắn											
	Peak area			Nồng độ DDT (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HD1	8.26	8.55		35.37	36.64		27.32%	-20.36%	2.99%	-47.69%	1.424%
HD2	5.54	8.07	5.52	23.72	34.58	23.63	29.34%	8.71%	21.04%	-20.63%	4.340%
HD3	6.10	6.00		26.10	25.69		29.99%	13.44%	0.98%	-16.55%	0.162%
HD4	4.35	4.77		18.60	20.39		32.01%	34.83%	4.24%	2.82%	0.119%
HD5	7.03	4.28	4.65	30.11	18.32	19.88	27.36%	23.88%	21.40%	-3.48%	0.744%
HD6	6.48	5.25	5.73	27.76	22.48	24.51	29.88%	16.70%	8.90%	-13.18%	1.173%
HD7	5.95	4.65	5.67	25.46	19.89	24.26	30.69%	22.44%	9.80%	-8.25%	0.809%
HD8	6.10	4.25	3.99	26.13	18.18	17.06	33.22%	31.61%	16.53%	-1.60%	0.265%

HD9	5.01	5.09		21.42	21.78		26.56%	27.79%	0.84%	1.23%	0.010%
HD10	4.62	4.35		19.78	18.61		31.01%	35.83%	2.75%	4.82%	0.133%
DDT21	2.83	4.12	5.60	12.08	17.63	23.95		40.21%	19.87%		
PAM64	5.08	4.75		21.73	20.30			29.75%	3.39%		
PAM67	4.69	3.72	4.22	20.07	15.90	18.02		39.84%	6.97%		
T006	5.54	6.02		23.72	25.79			17.25%	4.90%		
TN030	5.80	5.07		24.85	21.69			22.22%	7.47%		
Y042	4.83	5.78	4.65	20.67	24.76	19.91		27.19%	8.72%		
Y077	5.11	5.31	4.14	21.87	22.73	17.69		30.59%	9.01%		
2 tuần – môi trường rắn											
	Peak area			Nồng độ DDT (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HD1	2.83	2.26		12.28	9.75		37.60%	63.01%	6.00%	25.41%	1.523%
HD2	3.31	3.35		14.40	14.58		35.93%	51.33%	0.44%	15.40%	0.068%
HD3	7.48	5.61	3.10	32.79	24.52	13.44	35.91%	20.78%	32.61%	-15.13%	4.933%
HD4	2.26	2.85		9.76	12.36		34.24%	62.86%	6.17%	28.62%	1.767%
HD5	2.75	2.89		11.92	12.54		40.34%	58.92%	1.46%	18.59%	0.272%
HD6	2.46	3.34		10.62	14.52		38.25%	57.78%	9.28%	19.53%	1.813%
HD7	2.62	2.91		11.33	12.64		38.22%	59.75%	3.12%	21.52%	0.672%
HD8	2.96	3.05		12.85	13.26		36.14%	56.16%	0.97%	20.02%	0.195%
HD9	3.24	5.73		14.06	25.06		35.58%	34.30%	26.13%	-1.28%	0.335%
HD10	2.95	2.92		12.79	12.65		32.77%	57.28%	0.35%	24.51%	0.085%
DDT21	3.16	3.55		13.73	15.43			51.04%	4.04%		
PAM64	3.25	2.97		14.14	12.89			54.60%	2.96%		

PAM67	3.34	4.01		14.53	17.47			46.25%	6.97%		
T006	4.91	6.25		21.44	27.35			18.05%	14.04%		
TN030	4.26	4.25		18.59	18.53			37.66%	0.16%		
Y042	4.81	6.55	3.64	21.02	28.66	15.84		26.64%	21.67%		
Y077	6.06	6.24		26.51	27.31			9.61%	1.89%		

Phụ lục 11. Dữ liệu thô của thí nghiệm đánh giá hiệu suất phân giải Lindane của các chủng vi khuẩn tổ hợp, so sánh với hiệu suất phân giải Lindane của các chủng vi khuẩn đơn lẻ.

Ghi chú: Nồng độ Lindane trong mỗi mẫu được xác định bằng đường chuẩn đã thiết lập tại mỗi thời điểm đo. Hiệu suất phân giải lý thuyết của tổ hợp được tính bằng hiệu suất phân giải trung bình của các chủng vi khuẩn đơn lẻ trong tổ hợp. Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất = Hiệu suất phân giải thực tế - Hiệu suất phân giải lý thuyết.

<i>1 tuần – môi trường lỏng</i>											
	Peak area			Nồng độ Lindane (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HH1	12.69	12.47		40.57	39.88		7.35%	17.19%	1.01%	9.84%	0.099%
HH2	12.16	11.66		38.92	37.33		4.59%	21.52%	2.31%	16.92%	0.390%
HH3	11.60	12.70		37.16	40.58		7.42%	19.98%	4.99%	12.56%	0.626%
HH4	11.67	12.44		37.36	39.77		5.32%	20.61%	3.51%	15.28%	0.536%
HH5	12.21	13.51		39.07	43.12		7.02%	15.40%	5.90%	8.38%	0.495%
HH6	12.23	11.82		39.11	37.83		6.71%	20.80%	1.86%	14.09%	0.263%
HH7	13.32	13.32		42.53	42.54		7.94%	12.44%	0.02%	4.51%	0.001%
HH8	13.58	12.45		43.35	39.81		7.76%	14.40%	5.14%	6.64%	0.342%
HH9	14.06	13.75		44.85	43.90		10.59%	8.65%	1.38%	-1.93%	0.027%

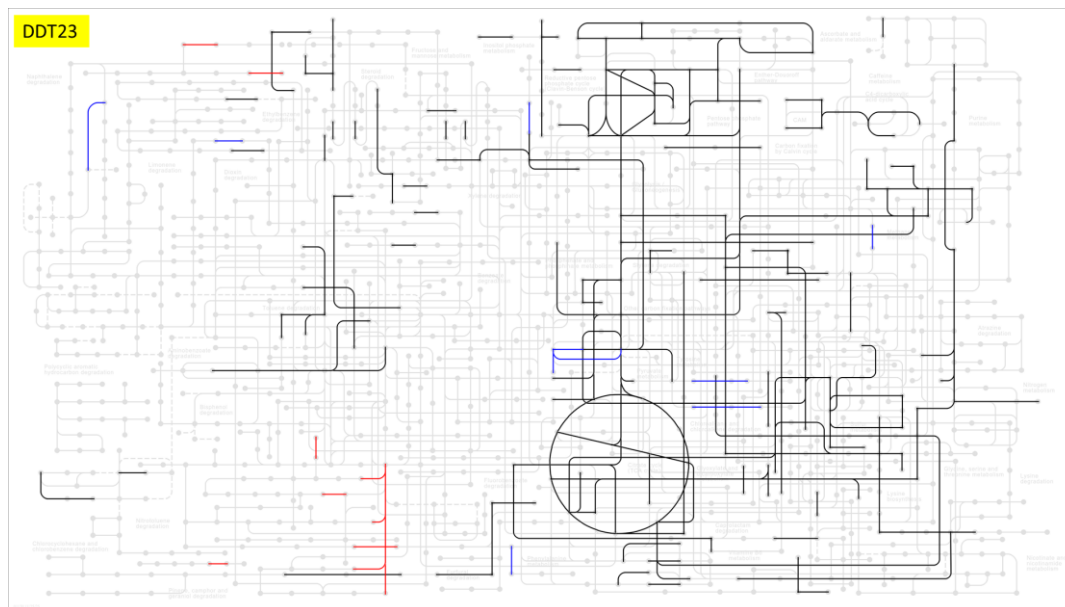
HH10	14.50	13.23		46.23	42.24		9.08%	8.93%	5.80%	-0.15%	0.009%
PAM66	13.87	12.64		44.26	40.41			12.84%	5.601%		
T69	13.05	13.40		41.69	42.78			13.05%	1.583%		
Y27	14.14	14.94		45.10	47.61			4.57%	3.649%		
Y50	14.67	12.53	15.81	46.76	40.07	50.35		5.86%	10.74%		
A119	15.81	12.90	15.48	50.33	41.22	49.30		3.35%	10.27%		
2 tuần – môi trường lỏng											
	Peak area			Nồng độ Lindane (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HH1	12.16	13.00		40.41	43.05		11.71%	10.60%	3.99%	-1.11%	0.044%
HH2	10.03	11.15		33.70	37.25		8.31%	24.01%	5.38%	15.70%	0.845%
HH3	10.45	8.00	11.86	35.03	27.31	39.47	10.07%	27.30%	13.18%	17.23%	2.271%
HH4	8.25	9.55		28.08	32.20		7.27%	35.43%	6.23%	28.15%	1.753%
HH5	11.65	12.88		38.82	42.68		8.33%	12.69%	5.84%	4.36%	0.255%
HH6	9.53	11.40		32.13	38.02		7.87%	24.85%	8.92%	16.99%	1.516%
HH7	11.44	11.00		38.15	36.75		8.58%	19.77%	2.13%	11.19%	0.239%
HH8	13.30	13.59		44.01	44.91		8.32%	4.75%	1.35%	-3.57%	0.048%
HH9	11.94	12.20		39.72	40.56		10.08%	14.01%	1.26%	3.93%	0.050%
HH10	11.98	11.43		39.84	38.11		7.87%	16.50%	2.63%	8.63%	0.227%
PAM66	13.35	11.55		44.17	38.50			11.44%	8.586%		
T69	13.18	13.18		43.62	43.63			6.54%	0.010%		
Y27	14.60	13.32		48.12	44.07			1.25%	6.129%		
Y50	12.91	11.75		42.78	39.12			12.27%	5.530%		
A119	13.96	10.95		46.09	36.61			11.41%	14.364%		

<i>1 tuần – môi trường bán rắn</i>											
	Peak area			Nồng độ Lindane (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HH1	18.81	20.13		42.48	45.65		21.57%	14.73%	4.34%	-6.84%	0.297%
HH2	20.39	19.16		46.28	43.33		23.62%	13.29%	4.04%	-10.34%	0.417%
HH3	20.40	19.47		46.30	44.06		18.48%	12.57%	3.06%	-5.91%	0.181%
HH4	16.60	18.03		37.20	40.62		19.62%	24.71%	4.68%	5.08%	0.238%
HH5	18.73	18.31		42.29	41.30		16.53%	19.13%	1.35%	2.59%	0.035%
HH6	17.00	15.81		38.15	35.29		22.20%	28.95%	3.92%	6.74%	0.264%
HH7	20.97	18.35		47.66	41.39		23.21%	13.83%	8.58%	-9.38%	0.804%
HH8	19.16	18.53		43.32	41.82		30.60%	17.61%	2.06%	-12.98%	0.267%
HH9	17.05	17.95		38.26	40.44		25.45%	23.85%	2.98%	-1.60%	0.048%
HH10	21.59	18.57	20.38	49.16	41.92	46.26	27.43%	11.41%	7.05%	-16.02%	1.130%
PAM66	15.52	18.86	15.94	34.59	42.61	35.62		27.23%	8.444%		
T69	18.19	19.36		41.01	43.80			17.94%	3.824%		
Y27	16.18	14.71		36.19	32.66			33.38%	4.841%		
Y50	16.62	15.23		37.23	33.90			31.18%	4.567%		
A119	22.83	20.15	20.87	52.11	45.69	47.44		6.31%	6.430%		
<i>2 tuần – môi trường bán rắn</i>											
	Peak area			Nồng độ Lindane (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HH1	16.62	19.09	21.66	39.75	45.34	51.14	25.01%	15.45%	10.60%	-9.56%	1.013%
HH2	18.62	18.27		44.27	43.47		32.26%	18.31%	1.05%	-13.94%	0.147%
HH3	18.46	17.49		43.91	41.71		27.31%	20.28%	2.90%	-7.03%	0.204%

HH4	14.23	14.33		34.33	34.56		23.31%	35.87%	0.30%	12.55%	0.038%
HH5	17.73	16.68		42.26	39.88		20.34%	23.53%	3.12%	3.18%	0.099%
HH6	13.00	16.49	16.02	31.56	39.45	38.38	30.87%	32.11%	7.97%	1.24%	0.099%
HH7	14.58	16.32	17.07	35.13	39.07	40.77	28.65%	28.64%	5.39%	-0.01%	0.001%
HH8	13.53	15.01		32.76	36.10		33.73%	35.89%	4.39%	2.16%	0.095%
HH9	15.64	14.95		37.52	35.96		28.78%	31.59%	2.06%	2.81%	0.058%
HH10	18.21	16.71	19.84	43.33	39.94	47.02	31.97%	19.13%	6.59%	-12.84%	0.847%
PAM66	18.91	17.28		44.92	41.23			19.79%	4.86%		
T69	16.64	16.27		39.79	38.95			26.69%	1.12%		
Y27	12.83	13.03		31.17	31.62			41.54%	0.59%		
Y50	12.05	14.60		29.41	35.18			39.87%	7.60%		
A119	19.67	18.62		46.64	44.26			15.37%	3.13%		
1 tuần – môi trường rắn											
	Peak area			Nồng độ Lindane (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HH1	4.32	4.44		30.84	31.71		17.15%	36.46%	1.25%	19.31%	0.242%
HH2	4.68	4.74		33.51	33.93		15.44%	31.50%	0.60%	16.06%	0.097%
HH3	6.80	5.38	6.55	48.86	38.56	47.08	13.21%	8.92%	11.19%	-4.29%	0.480%
HH4	5.42	5.42		38.89	38.89		12.00%	20.99%	0.00%	8.99%	0.000%
HH5	5.75	4.99		41.28	35.73		10.67%	21.77%	7.98%	11.10%	0.886%
HH6	5.86	6.75		42.04	48.56		12.05%	7.97%	9.36%	-4.07%	0.381%
HH7	4.99	5.20		35.72	37.30		12.38%	25.83%	2.27%	13.45%	0.305%
HH8	5.34	5.18		38.30	37.12		14.09%	23.39%	1.70%	9.30%	0.158%
HH9	5.48	5.60		39.30	40.15		11.87%	19.29%	1.21%	7.43%	0.090%
HH10	7.04	6.33		50.67	45.50		11.04%	2.31%	7.43%	-8.73%	0.649%

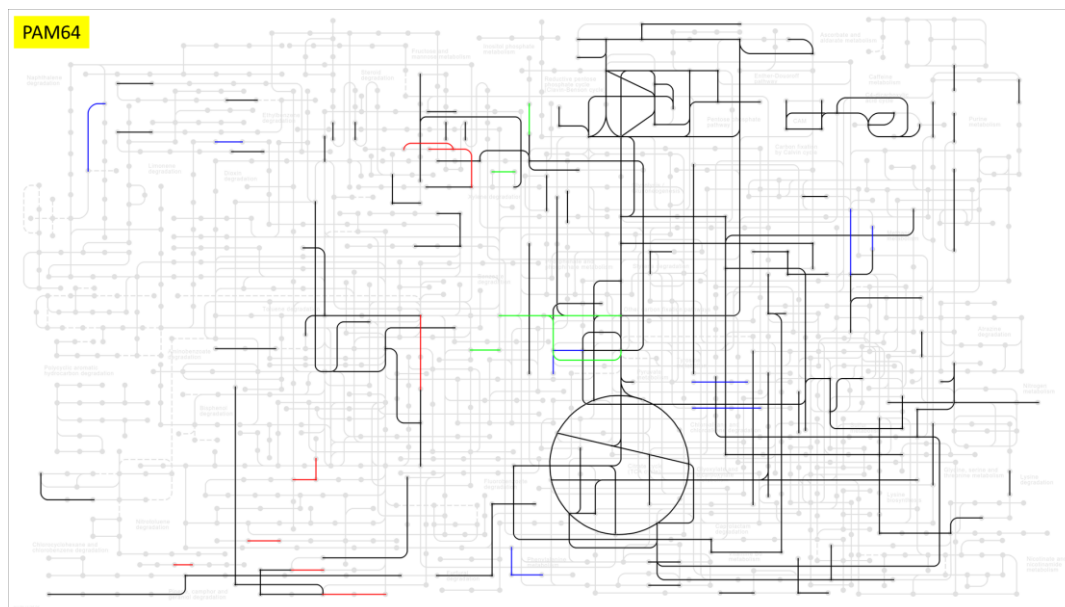
PAM66	6.38	5.45		45.84	39.12			13.70%	9.66%		
T69	6.91	6.53		49.70	46.90			1.87%	4.03%		
Y27	6.25	6.28		44.92	45.10			8.56%	0.27%		
Y50	5.88	5.10		42.19	36.54			20.03%	8.11%		
A119	5.25	6.04		37.65	43.34			17.74%	8.17%		
2 tuần – môi trường rắn											
	Peak area			Nồng độ Lindane (ppm) theo đường chuẩn			Hiệu suất phân giải lý thuyết	Hiệu suất phân giải thực tế	SD	Tỷ lệ chênh lệch hiệu suất	SD
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3					
HH1	5.12	4.23		35.85	29.57		23.62%	33.47%	9.04%	9.84%	0.890%
HH2	4.28	6.71		29.90	47.17		25.01%	21.63%	24.84%	-3.38%	0.839%
HH3	5.39	4.99		37.81	34.93		27.07%	26.02%	4.15%	-1.05%	0.044%
HH4	5.16	5.25		36.14	36.82		18.49%	25.80%	0.97%	7.31%	0.071%
HH5	5.77	5.89		40.53	41.35		19.73%	16.72%	1.17%	-3.00%	0.035%
HH6	6.83	5.79		48.01	40.65		25.70%	9.84%	10.59%	-15.86%	1.680%
HH7	5.41	5.84		37.94	41.01		24.04%	19.71%	4.42%	-4.33%	0.192%
HH8	5.85	5.93		41.06	41.65		20.00%	15.88%	0.84%	-4.12%	0.035%
HH9	6.17	6.42		43.35	45.12		22.07%	10.03%	2.56%	-12.04%	0.308%
HH10	6.33	5.49		44.51	38.52		21.94%	15.56%	8.62%	-6.39%	0.550%
PAM66	5.20	6.37		36.43	44.76			17.43%	11.97%		
T69	4.24	5.90		29.61	41.42			27.77%	16.99%		
Y27	5.41	5.58		37.95	39.16			21.58%	1.75%		
Y50	5.03	6.04		35.24	42.44			21.00%	10.35%		
A119	5.03	4.47		35.20	31.23			32.44%	5.71%		

Phụ lục 12. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng DDT23



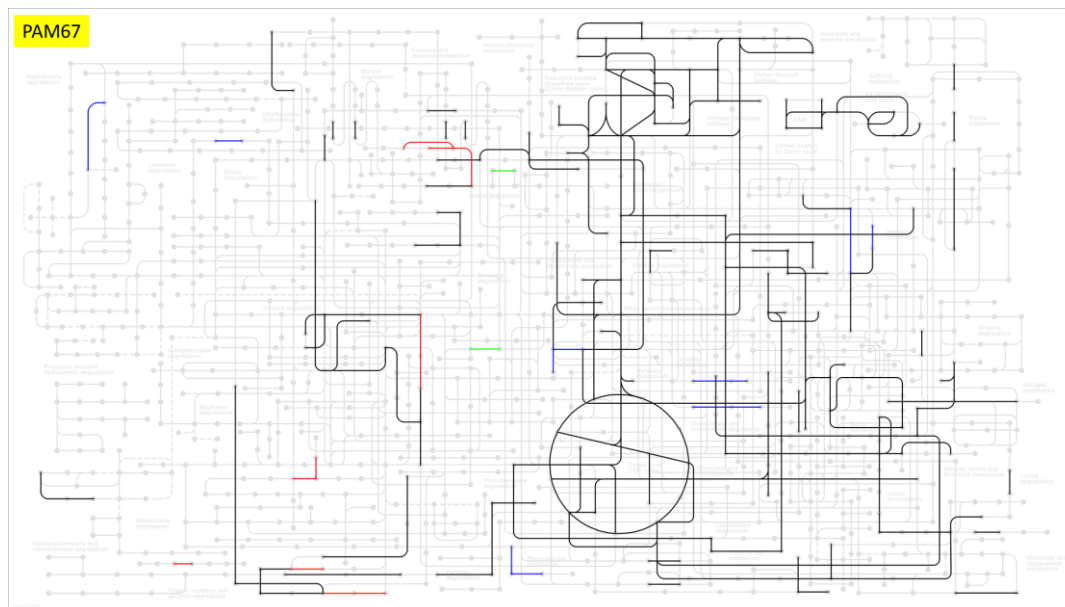
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 13. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng PAM64



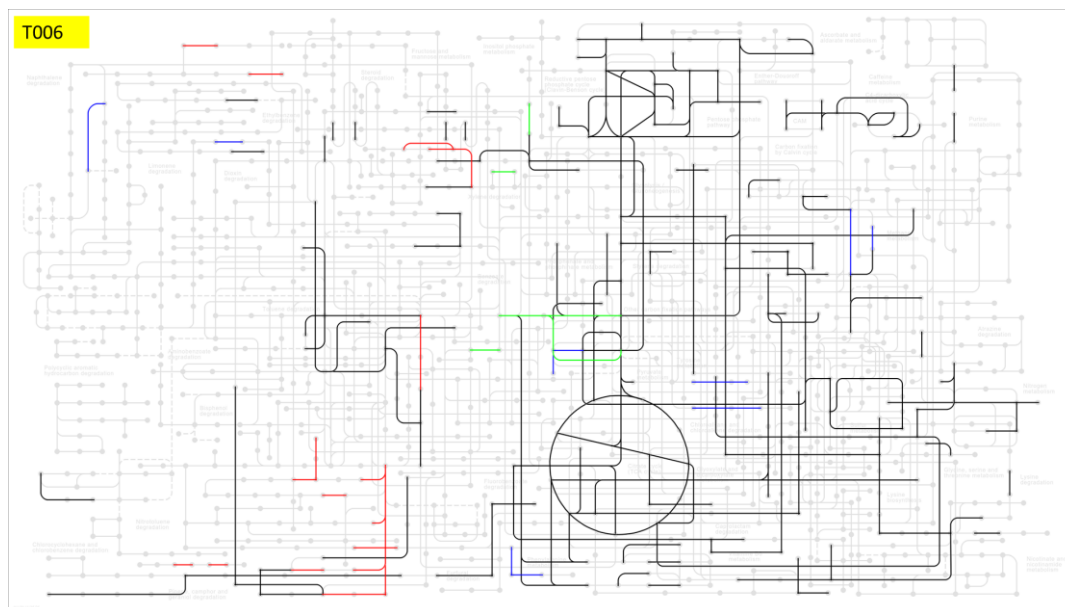
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy **chlorocyclohexane** và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 14. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng PAM67



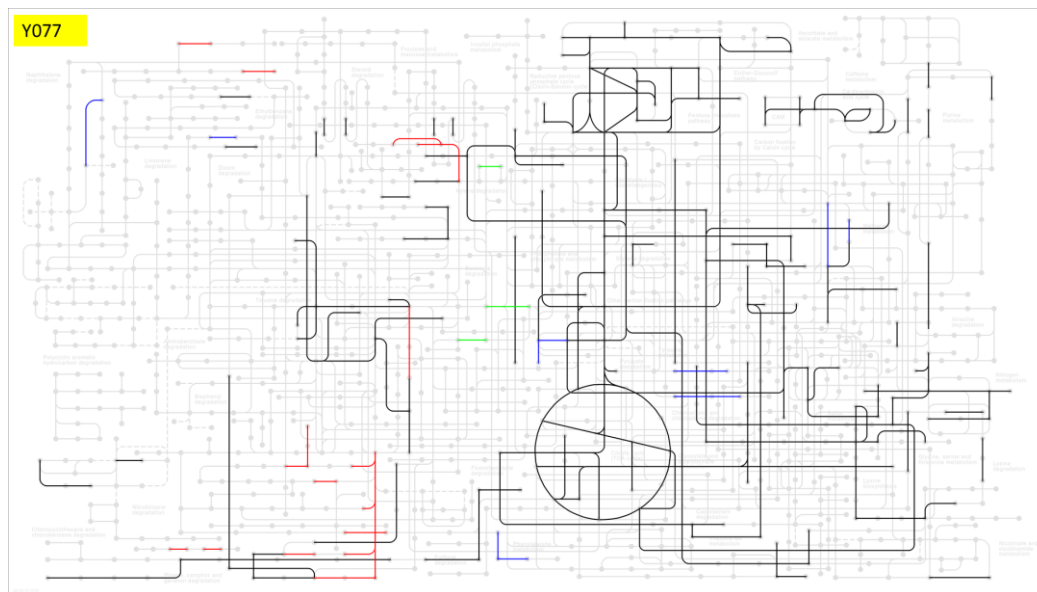
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 15. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng T006



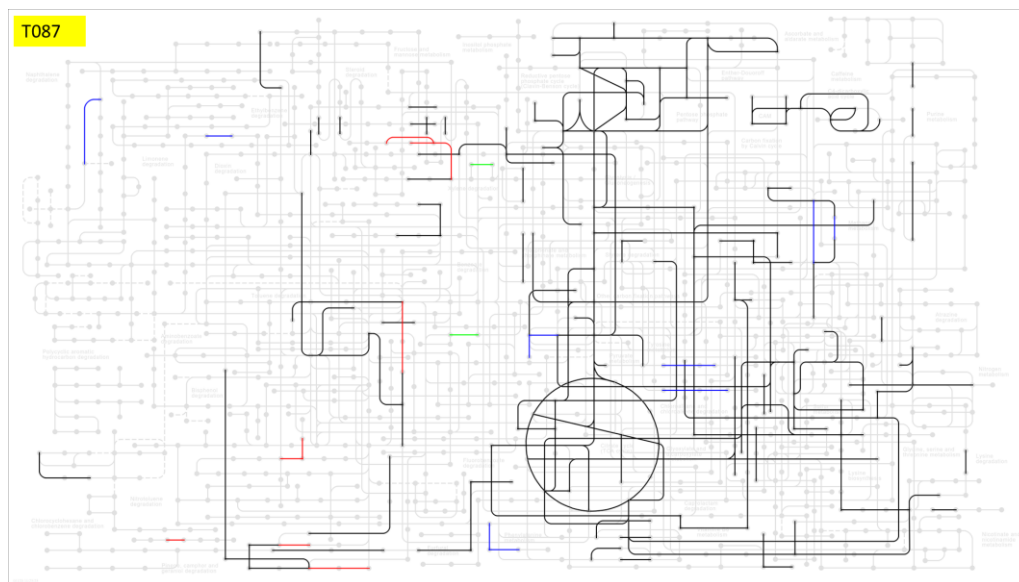
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 16. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng Y077



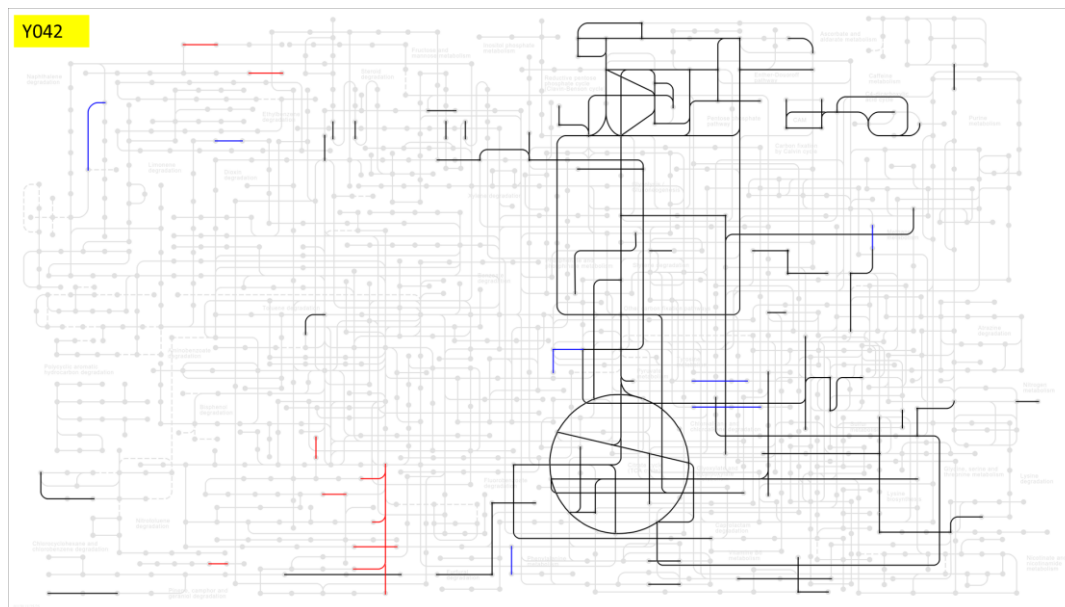
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 17. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng T087



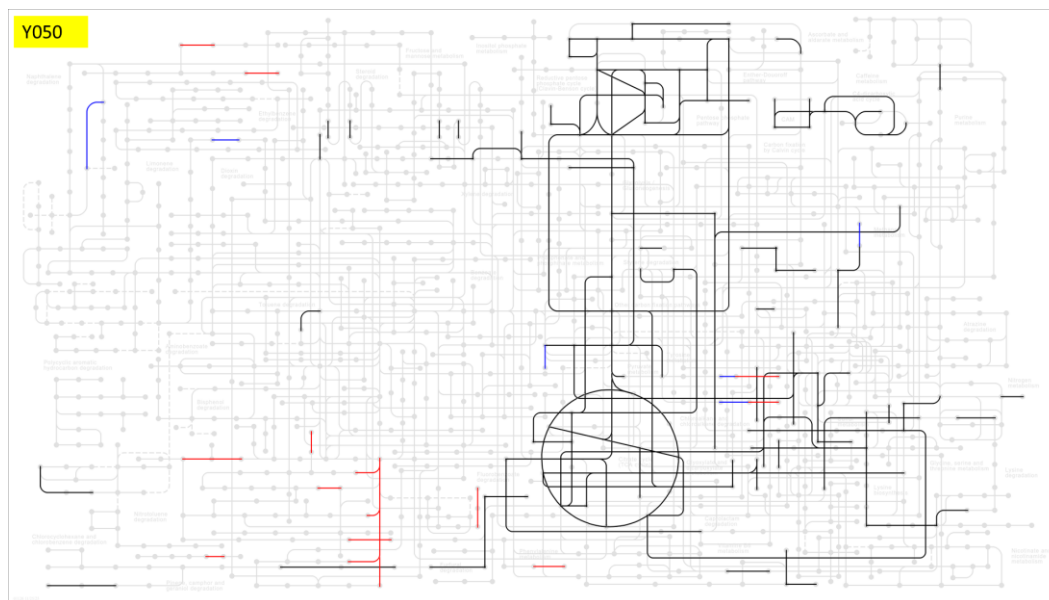
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 18. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng Y042



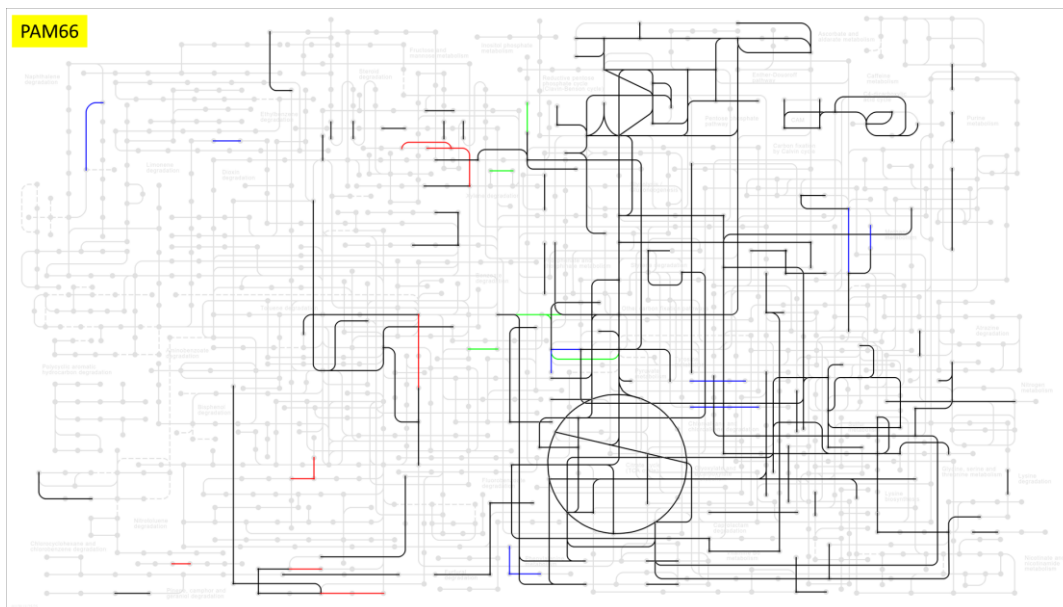
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 19. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng Y050



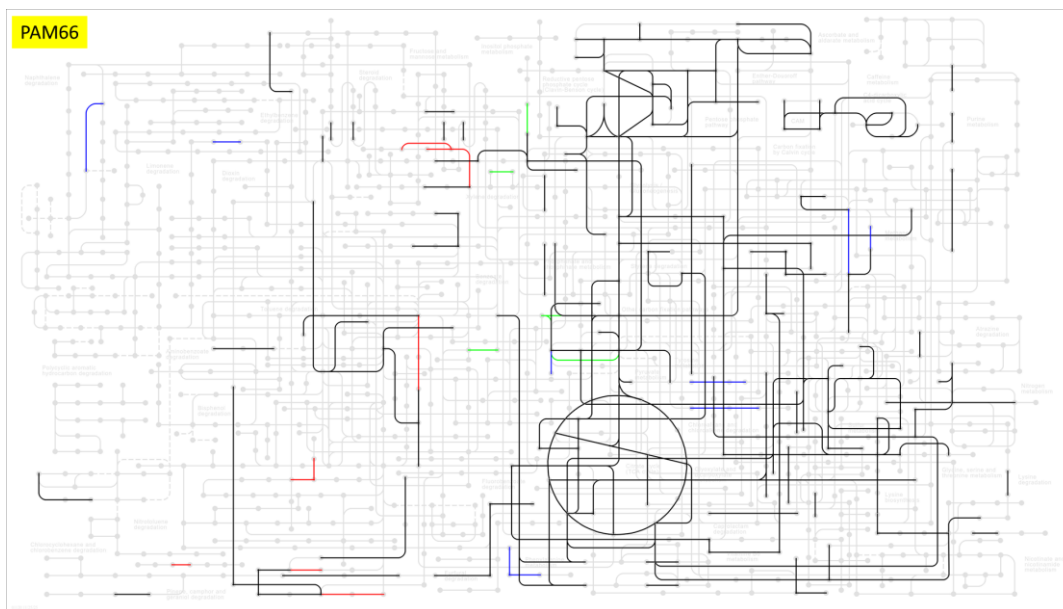
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 20. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng PAM65



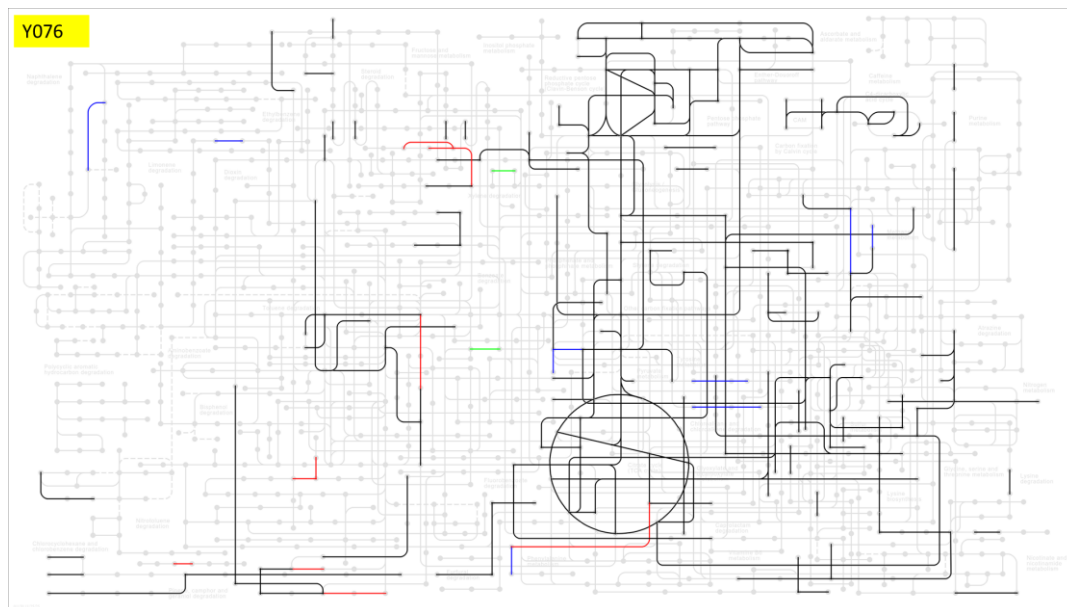
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 21. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng PAM66



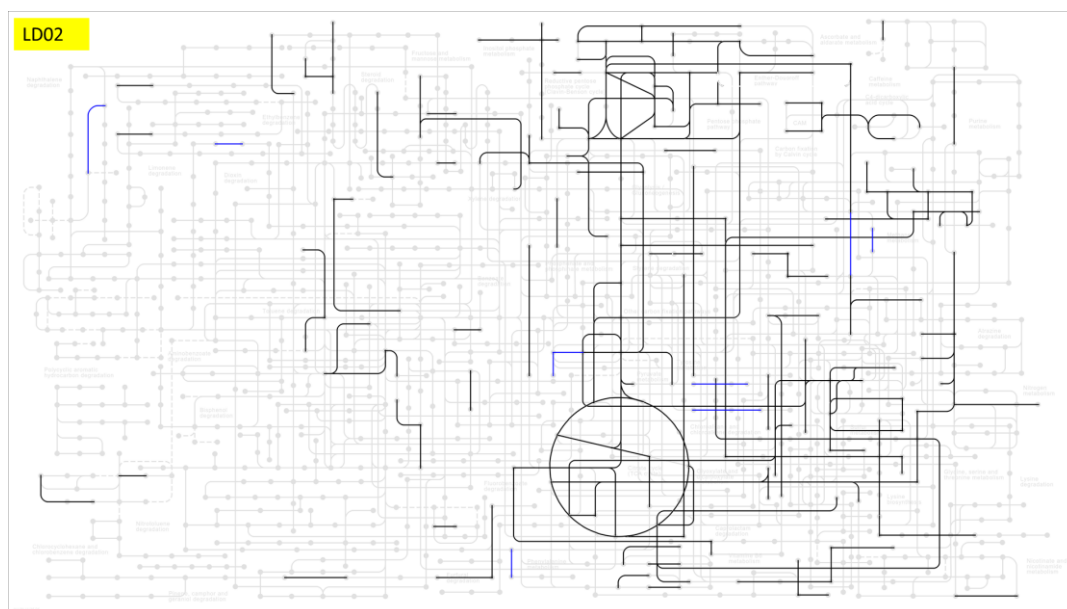
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 22. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng Y076



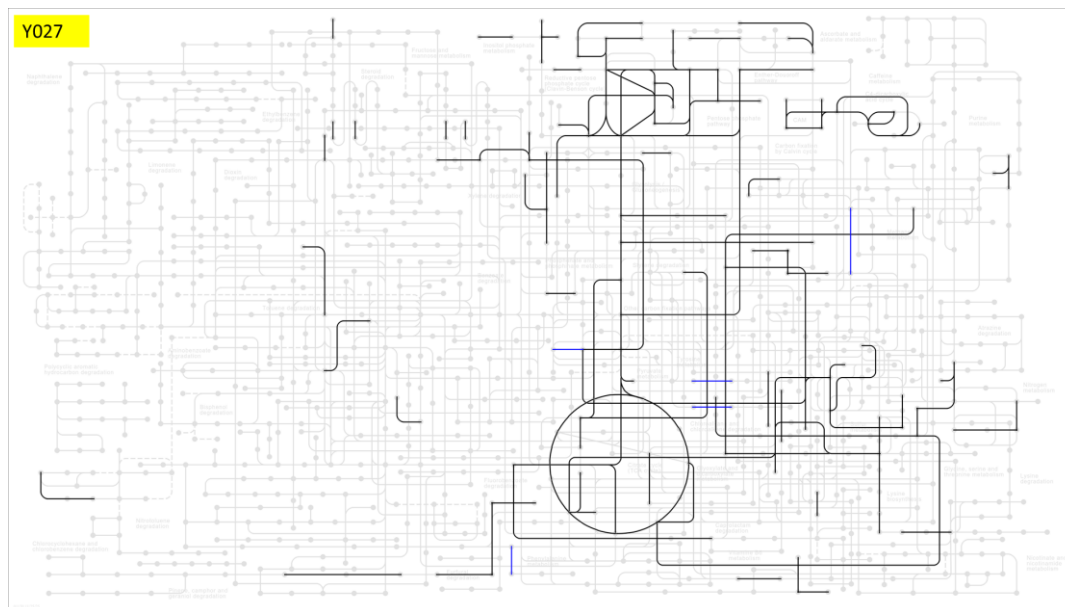
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 23. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng LD02



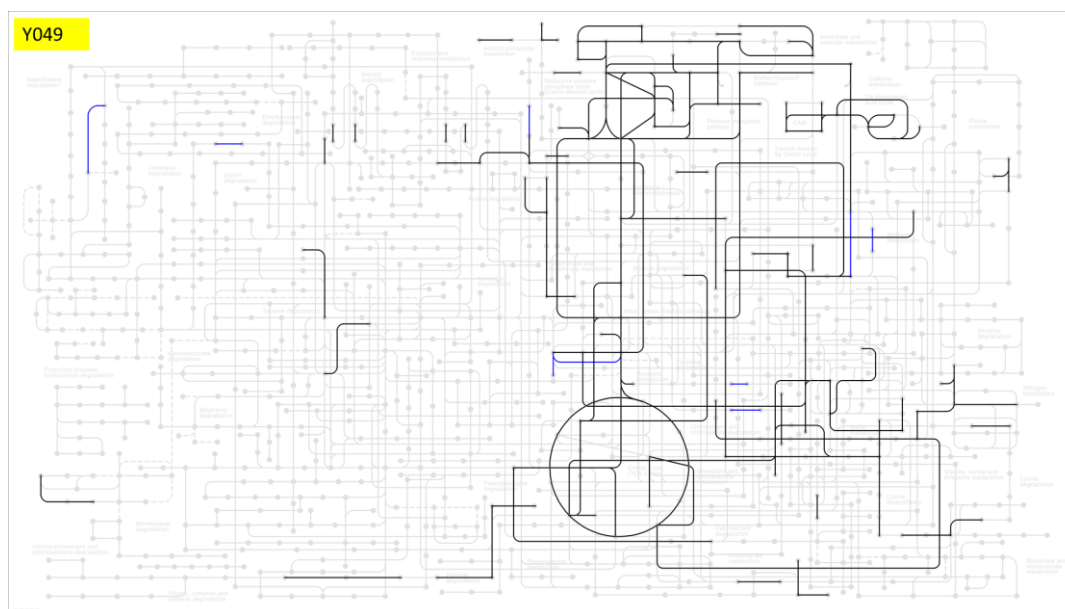
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 24. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng Y027



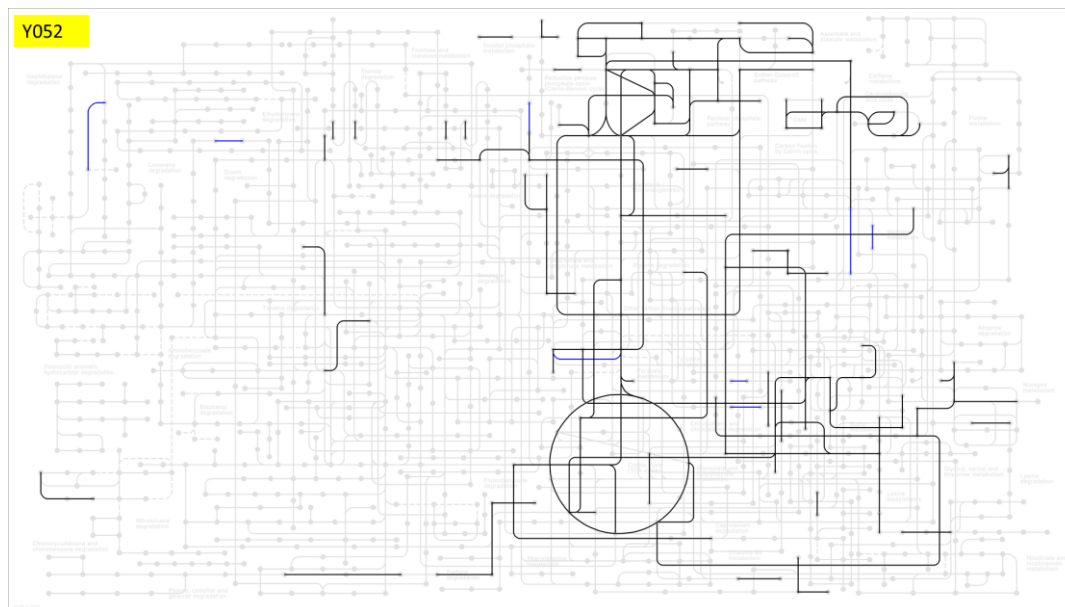
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 25. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng Y049



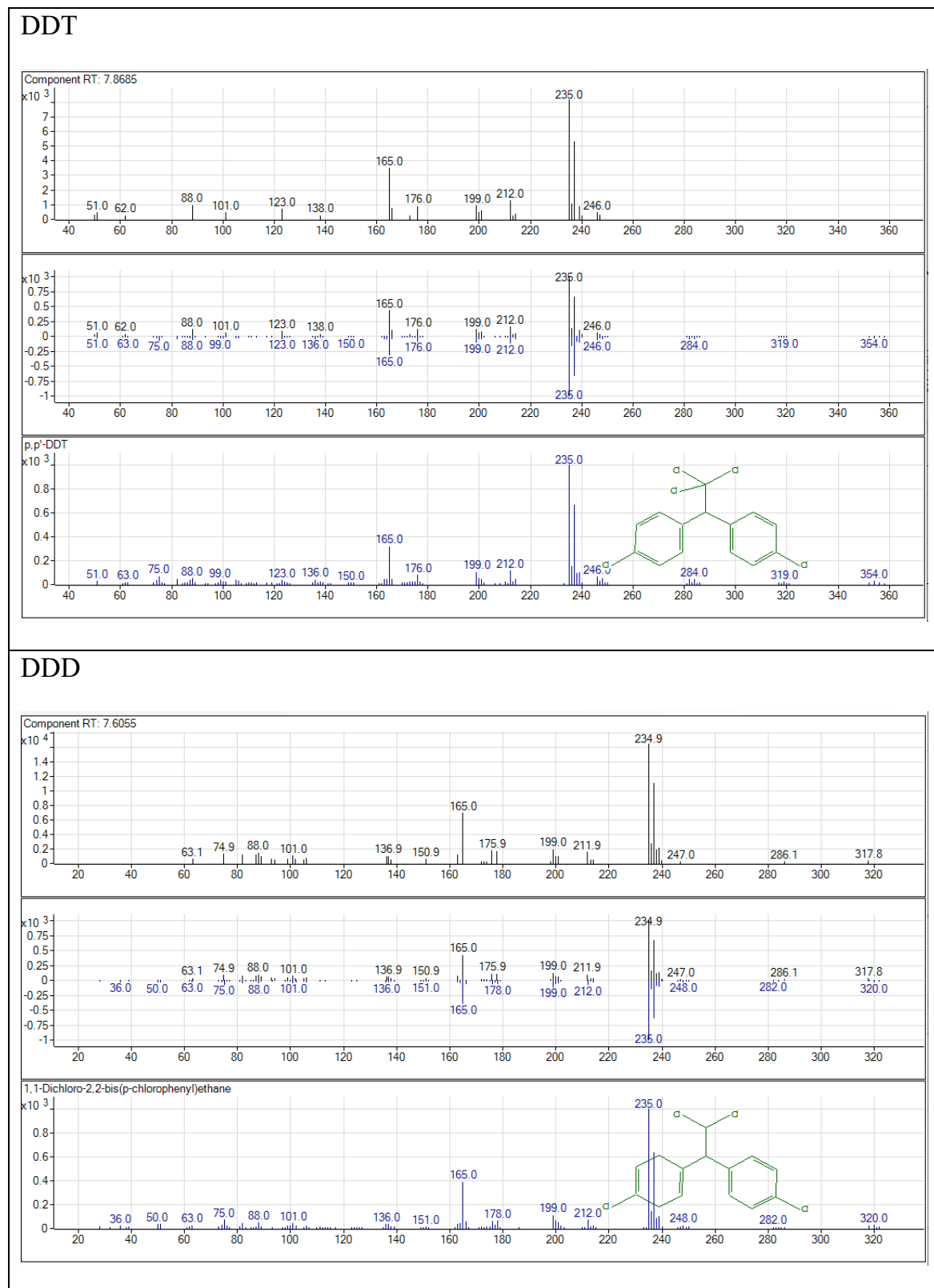
Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

Phụ lục 26. Bản đồ chuyển hóa lý thuyết của đơn chủng Y052

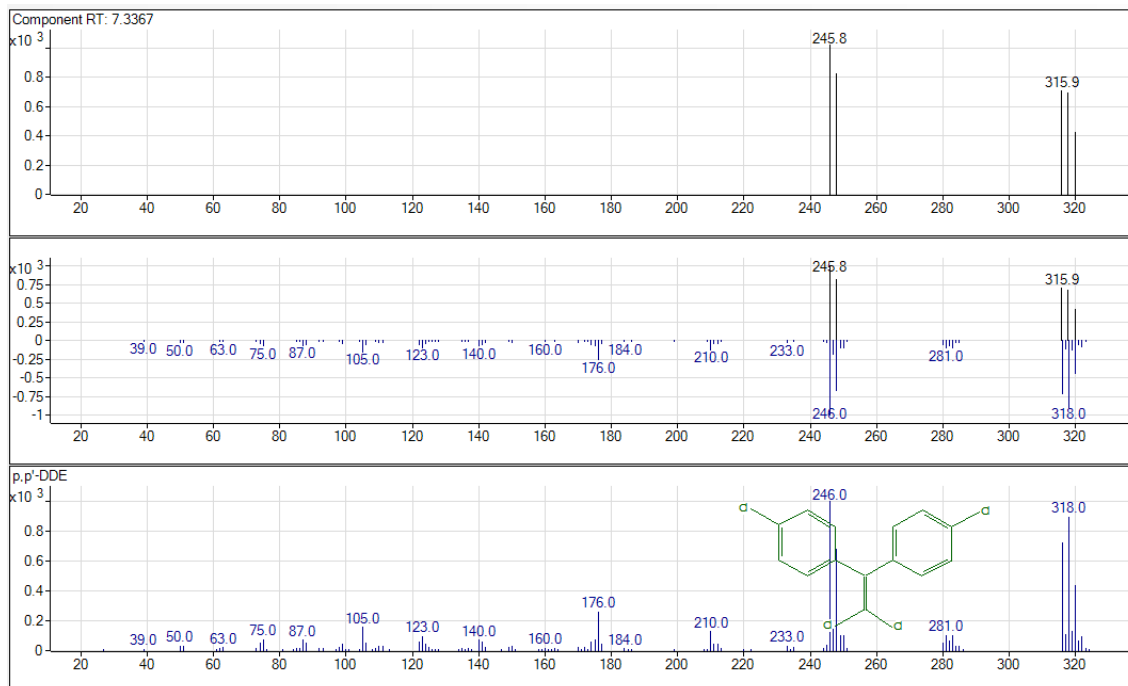


Ghi chú: Xanh dương: các con đường phân hủy chloroalkane và chloroalkene; Đỏ: các con đường phân hủy chlorocyclohexane và chlorobenzene; Xanh lá: các con đường phân hủy dioxin; Đen: các con đường chung

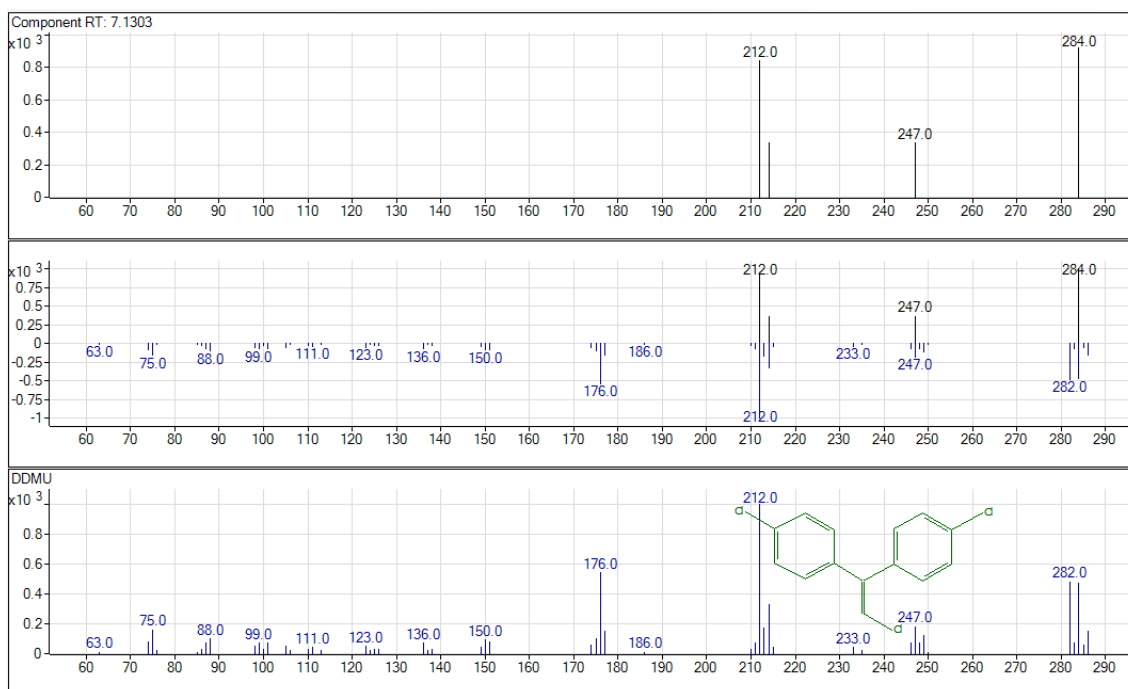
Phụ lục 27. Phổ khối và các cấu trúc đề xuất của sản phẩm phân hủy DDT



DDE

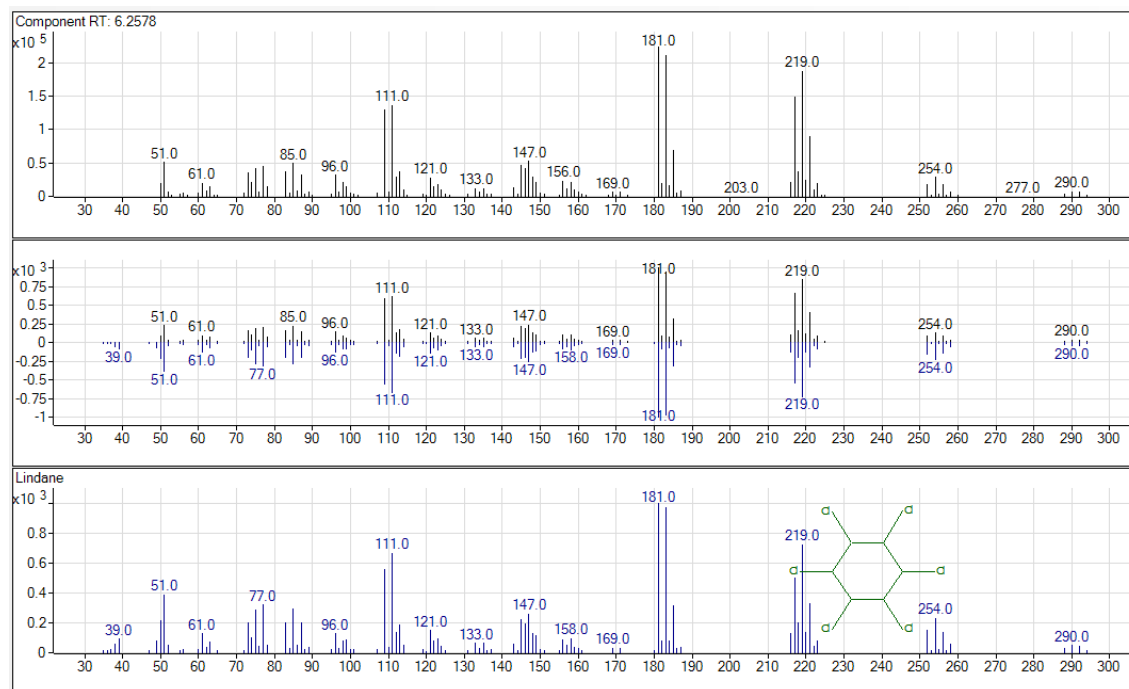


DDMU

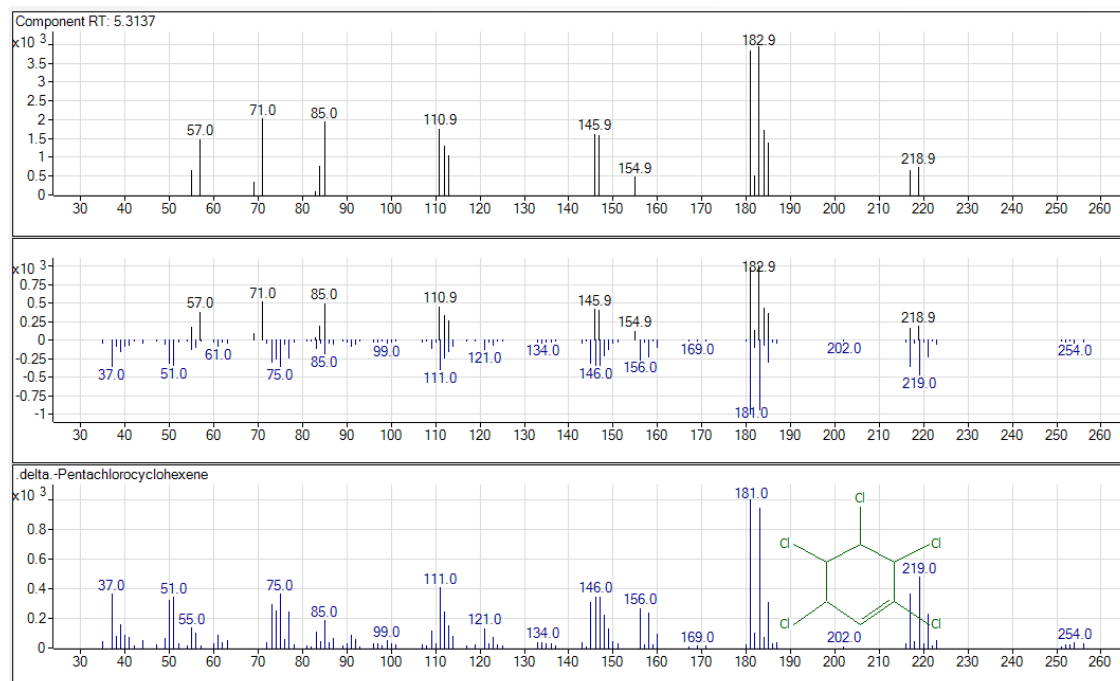


Phụ lục 28. Phổ khối và các cấu trúc đề xuất của sản phẩm phân hủy Lindane

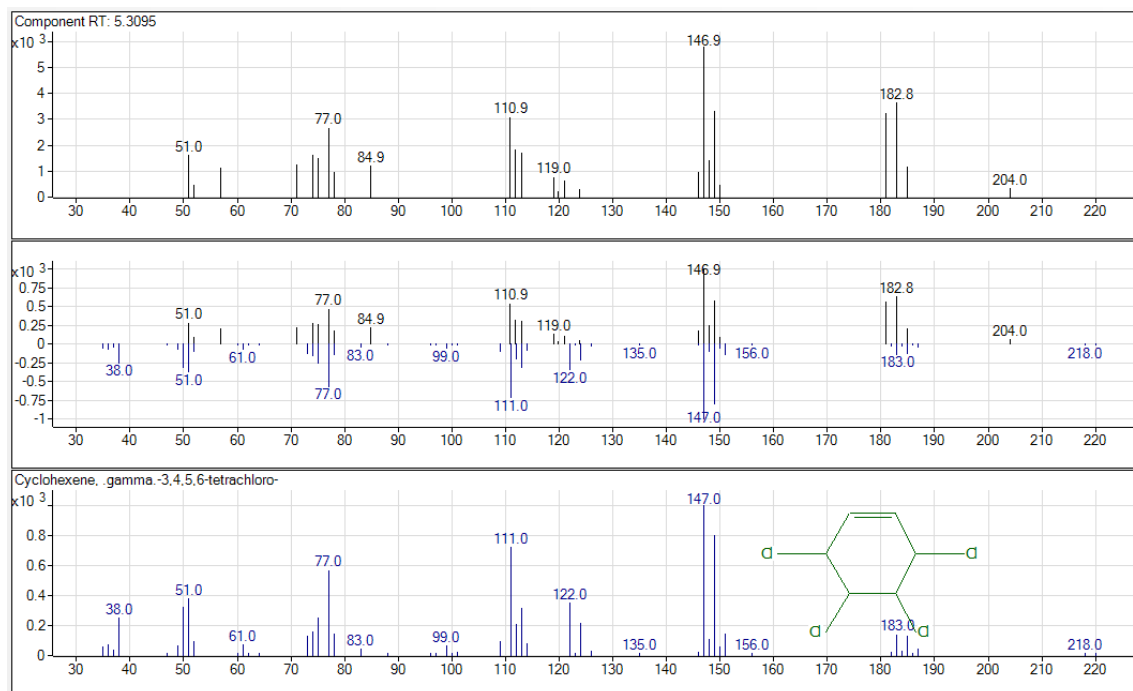
Lindane



PCCH



TCCH



Phụ lục 29. Triển khai mô hình xử lý ô nhiễm DDT tại Nghệ An

Nội dung	Hình ảnh
Vận chuyển chế phẩm HD4, đồ đạc từ Hà Nội vào Nghệ An. Bốc dỡ và kiểm kê chế phẩm, Tween 80 và các vật tư	
Đo đạc và chia lô thí nghiệm và đối chứng	
Đo độ ẩm của đất và tính toán lượng nước sẽ bổ sung vào mỗi hố sao cho độ ẩm đạt 70%	

Tại lô thí nghiệm, tiến hành đào các hố có độ sâu 80-100cm và rộng 100cm, các hố cách nhau khoảng 30-50 cm.	
Trao đổi với chính quyền địa phương và gia đình trước khi tiến hành	
Lắp đặt bể bạt và bơm nước giếng vào bể	
Dung dịch phụ gia (Tween 80) được tính toán trộn vào nước sao cho khi bổ sung vào đất đạt nồng độ 0,1%.	
Tính toán lượng nước cần bổ sung và hòa tan Tween 80	
Trộn đều lại chế phẩm HD4, chia lượng chế phẩm HD4 cần cho mỗi hố sao cho đạt 5% chế phẩm	
Trộn đều lượng đất của mỗi hố với chế phẩm HD4	
Trả lại đất đã trộn đều chế phẩm HD4 vào từng hố. Đồng thời, bổ sung nước đã pha dung dịch phụ gia.	

Đào trộn lại từng hố cho đều	
Hình ảnh hố đất sau khi được thi công xử lý và lấp lại	
Đánh giá hiệu quả: Mẫu đất được lấy theo các mốc thời gian dự tính và phân tích nồng độ DDT có trong mẫu	

Phụ lục 30. Triển khai mô hình xử lý ô nhiễm Lindane tại Hà Tĩnh

Nội dung	Hình ảnh
Đo đạc và chia lô thí nghiệm và đối chứng	
Máy xúc tiến hành xúc bỏ lớp đất trên bề mặt độ sâu 1m	
Đo độ ẩm của đất và tính toán lượng Tween 80 và nước cần bổ sung	
Trộn chế phẩm lại cho đều	

Rải chế phẩm lên lô thí nghiệm	
Máy xúc tiến hành đảo trộn chế phẩm và đất cho đều	
Tiến hành pha dung dịch phụ gia (Tween 80) vào nước	
Tưới nước đã pha Tween 80 vào lô thí nghiệm	
Máy xúc đảo trộn lại đất ở lô thí nghiệm 1 lượt	
Lấp lại phần đất đã xúc. Hoàn trả lại mặt bằng	
Đánh giá hiệu quả: Mẫu đất được lấy theo các mốc thời gian dự tính và phân tích nồng độ Lindane có trong mẫu.	