

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Trần Hương Quỳnh**

**NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG PHÂN HỦY HỢP CHẤT  
ĐA VÒNG THƠM BỞI XẠ KHUẨN CỐ ĐỊNH TRÊN THAN SINH  
HỌC ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT MÔI TRƯỜNG**

*Hà Nội - Năm 2024*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Trần Hương Quỳnh**

**NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG PHÂN HỦY HỢP CHẤT  
ĐA VÒNG THƠM BỞI XẠ KHUẨN CỐ ĐỊNH TRÊN THAN SINH  
HỌC ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT MÔI TRƯỜNG**  
**Mã số: 8 52 03 20**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :**

**1. TS. Nguyễn Phương Minh**

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.

**2. TS. Đào Thị Ngọc Ánh**

A handwritten signature in black ink, featuring a stylized 'D' and 'T' followed by a long horizontal stroke.

**Hà Nội - Năm 2024**

**LỜI CAM ĐOAN**

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

**Học viên****Trần Hương Quỳnh**

## LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến thầy cô hướng dẫn luận văn là TS. Nguyễn Phương Minh và TS. Đào Thị Ngọc Ánh về những lời chỉ bảo, sự giúp đỡ tận tình cũng như sự động viên chân thành đối với tôi trong suốt quá trình viết Luận văn.

Xin trân trọng cảm ơn đến Ban lãnh đạo, các cán bộ, giảng viên của Học viện khoa học và công nghệ/ Viện đã tạo điều kiện học tập, các thầy cô truyền dạy những kiến thức nền tảng - hiện đại, tạo điều kiện thực nghiệm; Phòng Đào tạo và các phòng ban chức năng thuộc Học viện Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ các thủ tục hành chính, hướng dẫn chi tiết, cụ thể, tỉ mỉ trong việc hoàn thành bài Luận văn này.

Xin trân trọng cảm ơn Thủ trưởng, cán bộ nhân viên Viện hóa học môi trường quân sự/Binh chủng hóa học đã tạo điều về thời gian và công việc, giúp tôi học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn sự hợp tác giữa Binh chủng hóa học/Bộ Quốc phòng và Viện Công nghệ sinh học /Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện cho tôi sử dụng kết quả phân lập ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 trong đất ô nhiễm chất độc hóa học dioxin tại sân bay Aso, huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế được tôi dùng trong quá trình nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 24 tháng 11 năm 2024

Học viên



**Trần Hương Quỳnh**

## MỤC LỤC

<b>LỜI CẢM ƠN.....</b>	<b>ii</b>
<b>DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT.....</b>	<b>v</b>
<b>DANH MỤC BẢNG.....</b>	<b>vi</b>
<b>DANH MỤC HÌNH.....</b>	<b>vii</b>
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>4</b>
1.1. Hợp chất ô nhiễm hydrocarbon đa vòng thơm (PAHs – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons).....	4
1.2. Độc tính của PAHs .....	5
1.3. Các nguồn phát sinh PAHs .....	5
1.3.1. Nguồn tự nhiên .....	5
1.3.2. Nguồn nhân tạo.....	6
1.4. Ảnh hưởng của PAHs .....	6
1.4.1. Ảnh hưởng đến con người .....	6
1.4.2. Ảnh hưởng đến môi trường sinh thái.....	6
1.2. Tổng quan về than sinh học (TSH).....	7
1.2.1. Giới thiệu chung .....	7
1.2.2. Nguyên liệu sản xuất than sinh học.....	8
1.2.3. Tính chất hóa - lý của than sinh học.....	9
1.2.4. Vai trò của than sinh học .....	12
1.2.5. Ứng dụng của than sinh học .....	14
1.3. Tổng quan về xạ khuẩn.....	14
1.3.1. Giới thiệu về xạ khuẩn.....	14
1.3.2. Một số vai trò của xạ khuẩn trong xử lý môi trường.....	15
1.4. Vi sinh vật cố định trên than sinh học ứng dụng trong xử lý ô nhiễm môi trường.....	17
1.4.1. Kỹ thuật cố định vi khuẩn trên than sinh học.....	18
1.4.2. Ứng dụng vi khuẩn cố định trên than sinh học trong xử lý môi trường.....	19
1.5 Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam .....	21
<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>23</b>
2.1. Vật liệu, hóa chất, dụng cụ và thiết bị .....	23

2.1.1. Vật liệu, đối tượng nghiên cứu .....	23
2.1.2. Hóa chất, môi trường .....	23
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	25
2.2.1. Sơ đồ thí nghiệm .....	25
2.2.2. Thiết kế thí nghiệm phân hủy phenanthrene .....	27
2.2.3. Phương pháp bảo quản và giữ giống vi sinh vật .....	27
2.2.4. Phương pháp tăng sinh sinh khối các chủng xạ khuẩn.....	27
2.2.5. Phương pháp xác định mật độ theo phương pháp xác định đơn vị hình thành xạ khuẩn .....	27
2.2.6. Phương pháp chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) .....	27
2.2.7. Phương pháp cố định vi sinh vật trên than sinh học.....	27
2.2.8. Phương pháp phân tích phenanthrene.....	29
2.2.9. Phương pháp xử lý số liệu .....	32
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>33</b>
3.1. Cố định xạ khuẩn trên than sinh học .....	33
3.2. Lập phương trình đường chuẩn phân tích phenanthrene .....	34
3.3. Khả năng phân hủy phenanthrene của ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 trong môi trường dịch thể.....	34
3.4. Khả năng phân hủy phenanthrene của các chủng xạ khuẩn được cố định trên than sinh học trong môi trường dịch thể.....	37
3.5. Khả năng phân hủy phenanthrene của các chủng xạ khuẩn được cố định trên than sinh học trong môi trường đất ô nhiễm .....	40
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>44</b>
<b>KẾT LUẬN</b> .....	44
<b>KIẾN NGHỊ</b> .....	44
<b>DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>45</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>53</b>

**DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT**

<b>STT</b>	<b>Ký tự viết tắt</b>	<b>Tiếng Anh (nếu có)</b>	<b>Tiếng Việt</b>
1	PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	Hợp chất hydrocarbon đa vòng thơm
2	PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon	Hydrocarbon đa vòng thơm
3	TSH	Biochar	Than sinh học
4	US EPA	United States Environmental Protection Agency	Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ
5	MB	Metribuzin	Metribuzin
6	WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
7	UPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography	Hệ thống thiết bị phân tích sắc ký lỏng siêu hiệu năng
8	SEM	Scanning Electron Microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
9	DAD	Diode Array Detector	Đầu dò diode
10	R	Correlation Coefficient	Hệ số tương quan

## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng 1.1:</b> Sử dụng vi khuẩn cố định trên TSH để loại bỏ hợp chất gây ô nhiễm .....	19
<b>Bảng 2.1:</b> Hóa chất sử dụng trong tách chiết, phân tích phenanthrene..	24
<b>Bảng 2.2:</b> Thành phần cho 1000 mL môi trường Gause cải tiến .....	24
<b>Bảng 2.3:</b> Trang thiết bị và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu .....	24
<b>Bảng 2.4:</b> Chương trình rửa giải gradient UPLC .....	30
<b>Bảng 3.1:</b> Số lượng xạ khuẩn phát triển trên TSH khử trùng và không khử trùng .....	33
<b>Bảng 3.2:</b> Trung bình chiều dài đường kính và chiều dài gai của ba chủng xạ khuẩn.....	34
<b>Bảng 3.3:</b> Khảo sát khoảng tuyến tính của phenanthrene .....	34
<b>Bảng 3.4:</b> Nồng độ phenanthrene còn lại và phần trăm phân hủy trong môi trường dịch thể của ba chủng xạ khuẩn ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	35
<b>Bảng 3.5:</b> Nồng độ phenanthrene còn lại và phần trăm phân hủy trong môi trường dịch chứa xạ khuẩn gắn trên TSH ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....	38
<b>Bảng 3.6:</b> Nồng độ phenanthrene còn lại và phần trăm phân hủy trong môi trường đất chứa xạ khuẩn gắn trên TSH ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....	40
<b>Bảng I.1:</b> Danh mục ký hiệu mẫu chạy UPLC và môi trường nuôi cấy của ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 .....	53



## DANH MỤC HÌNH

<b>Hình 1.1:</b> Cấu trúc hóa học của 16 hydrocacbon đa vòng thơm (PAH) đại diện theo quyết định của Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ (US EPA) 4	
<b>Hình 1.2:</b> Sự khác nhau giữa đất chứa lớp Terra Preta và đất thường..... 7	
<b>Hình 1.3:</b> Một số dạng TSH được sản xuất từ các nguyên liệu khác nhau ..... 8	
<b>Hình 1.4:</b> Cấu trúc dưới kính hiển vi của TSH ..... 11	
<b>Hình 1.5:</b> Một số kỹ thuật cố định vi khuẩn trên than sinh học..... 18	
<b>Hình 1.6:</b> Ảnh hiển vi điện tử quét SEM sự xâm nhập của vi khuẩn trên bề mặt TSH..... 18	
<b>Hình 1.7:</b> Cơ chế TSH cố định vi khuẩn..... 19	
<b>Hình 2.1:</b> Kích thước chiều dài và chiều rộng của hạt trấu..... 23	
<b>Hình 2.2:</b> Sơ đồ tóm tắt thí nghiệm..... 27	
<b>Hình 2.3:</b> Kết quả chạy UPLC ở các nồng độ phenanthrene khác nhau 31	
<b>Hình 2.4:</b> Phương trình đường chuẩn phenanthrene phân tích trên máy UPLC..... 32	
<b>Hình 3.1:</b> Ảnh chụp SEM hình thái cấu trúc của ba chủng xạ khuẩn được cố định trên TSH ..... 34	
<b>Hình 3.2:</b> Biểu đồ thể hiện phần trăm phenanthrene còn lại sau khi nuôi cấy của 3 chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường dịch thể..... 36	
<b>Hình 3.3:</b> Biểu đồ thể hiện phần trăm phenanthrene còn lại sau khi nuôi cấy của 3 chủng xạ khuẩn cố định trên TSH được nuôi cấy trong môi trường dịch thể ..... 38	
<b>Hình 3.4:</b> Biểu đồ thể hiện phần trăm phenanthrene còn lại sau khi nuôi cấy của 3 chủng xạ khuẩn cố định trên TSH được nuôi cấy trong môi trường dịch thể ..... 41	
<b>Hình II.1:</b> Mẫu TSH cố định xạ khuẩn ..... 54	
<b>Hình II.2:</b> Mẫu đối chứng và thí nghiệm chủng xạ khuẩn được nuôi cấy môi trường dịch thể ..... 54	
<b>Hình II.3:</b> Mẫu đối chứng và thí nghiệm TSH có gắn chủng xạ khuẩn được nuôi cấy môi trường dịch thể có chứa phenanthrene ..... 55	
<b>Hình II.4:</b> Mẫu đối chứng và thí nghiệm TSH có gắn chủng xạ khuẩn được nuôi cấy môi trường đất có chứa phenanthrene ..... 55	
<b>Hình II.5:</b> Hình ảnh mẫu đất được trộn lẫn TSH có gắn chủng xạ khuẩn ..... 56	

## MỞ ĐẦU

### 1. Lý do lựa chọn đề tài

Công nghệ cố định vi sinh vật đã được phát triển nhanh chóng và được sử dụng để loại bỏ các chất ô nhiễm trong môi trường trong những năm gần đây, do tính ổn định cao, tốc độ phản ứng nhanh và hoạt động cao. Các phương pháp vật lý, hóa học, sinh học và các phương pháp kết hợp đã được đề xuất và ứng dụng vào công nghệ xử lý ô nhiễm môi trường. Trong đó, xử lý sinh học là công nghệ xử lý làm sạch đất được công nhận rộng rãi, quá trình này sử dụng các hoạt động trao đổi chất, hệ enzyme của vi sinh vật để giảm thiểu hoặc loại bỏ chất ô nhiễm trong đất. Trong công nghệ này, chất gây ô nhiễm không được chuyển từ môi trường này sang môi trường khác nên công nghệ xử lý này tương đối an toàn, thân thiện với môi trường và có tính kinh tế cao. Chất mang cố định vi sinh vật có chi phí thấp và hiệu quả loại bỏ cao là chìa khóa của công nghệ xử lý ô nhiễm môi trường. Than sinh học (TSH) được coi là chất mang hiệu quả để cố định vi sinh vật do độ xốp cao và hiệu ứng hấp phụ tốt, có thể cung cấp môi trường sống cho vi sinh vật. Việc sử dụng vi sinh vật cố định than sinh học để xử lý các chất ô nhiễm khác nhau trong nước thải là một phương pháp xử lý đầy hứa hẹn. So với các công nghệ xử lý sinh học khác, vi sinh vật cố định than sinh học có thể cải thiện sự phong phú của vi khuẩn, tỷ lệ sử dụng lặp lại, khả năng trao đổi chất của vi khuẩn,... Tuy nhiên, nghiên cứu hiện tại về phương pháp này vẫn còn trong giai đoạn sơ khai. Người ta ít chú ý đến cơ chế tương tác giữa than sinh học và vi sinh vật và nhiều nghiên cứu chỉ được thực hiện trong phòng thí nghiệm. Vẫn còn những vấn đề như khó phục hồi sau khi sử dụng và ô nhiễm thứ cấp do các chất ô nhiễm còn sót lại sau khi hấp phụ TSH, cần được làm rõ thêm.

Phenanthrene được đại diện là đối tượng nghiên cứu cho hợp chất ô nhiễm đa vòng thơm trong bài nghiên cứu này. Phenanthrene được biết đến trong tổng hợp các chất hữu cơ như thuốc nhuộm, thuốc trừ sâu,.. và là một trong những tác nhân gây ô nhiễm khó phân hủy nhất. Lựa chọn phenanthrene đại diện cho hợp chất ô nhiễm đa vòng thơm nhằm nghiên cứu xem vi khuẩn cố định TSH có thể tăng cường, thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học phe trong đất hay không và sự kết hợp giữa TSH và vi khuẩn có tác dụng hỗ trợ nhau trong quá trình loại bỏ sinh học hiếu khí của phenanthrene hay không. Điều này sẽ góp phần vào nghiên cứu và khắc phục đất ô nhiễm PAHs.

TSH là vật liệu giàu cacbon được tạo ra bằng quá trình nhiệt phân kỵ khí sinh khối. Nó có diện tích bề mặt riêng lớn và xốp, cho phép nó hấp thụ và cố định hợp chất ô nhiễm trong đất. Khi được thêm vào đất, TSH sẽ bổ sung hàm lượng cacbon hữu cơ cho đất, điều chỉnh độ pH của đất và tăng khả năng trao đổi cation của đất, tạo điều kiện lý tưởng cho sự sống sót của vi khuẩn. Ngoài ra, TSH cung cấp nơi trú ẩn và dinh dưỡng cho vi khuẩn, thậm chí còn kích

thích chúng phân hủy chất ô nhiễm. Do đó, việc tích hợp TSH và vi khuẩn ngày càng được sử dụng như một phức hợp xử lý hiệu quả, dễ thích ứng và bền vững hơn đối với đất bị ô nhiễm. Vài năm gần đây, ứng dụng TSH để xử lý ô nhiễm môi trường mang lại được nhiều sự chú ý với ưu điểm là hàm lượng cacbon cao, tăng khả năng trao đổi cation, độ xốp, độ ổn định và nhóm chức năng bề mặt phong phú. Với bản chất là hệ cacbon hữu cơ với các đặc tính vượt trội, khi đưa vào đất, TSH có tác dụng như một chất cải tạo đất giúp nâng cao lượng mùn, tăng cường hoạt động vi sinh vật, khả năng giữ nước, giữ ẩm, chất dinh dưỡng, từ đó tác động tích cực đến sức khỏe nền đất canh tác. Hiệu quả của TSH trong việc quản lý chất gây ô nhiễm phụ thuộc vào sự phân bố kích thước lỗ rỗng, nhóm bề mặt và khả năng trao đổi ion. Thành phần phân tử và cấu trúc vật lý của TSH có thể rất quan trọng khi áp dụng thực tế vào nước và đất. Công nghệ sử dụng TSH cố định vi sinh vật nhằm xử lý môi trường tuy đã được áp dụng nhưng nghiên cứu đối với xạ khuẩn còn nhiều hạn chế. Tại Việt Nam, TSH đã được nghiên cứu ứng dụng trong xử lý môi trường ví dụ như xử lý ô nhiễm dầu. Hợp chất ô nhiễm đa vòng thơm (ví dụ như phenanthrene) là hợp chất tồn tại lâu dài trong đất, chúng ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe con người và có thể gây ung thư. Việc tìm ra công nghệ phân hủy, loại bỏ là rất cần thiết đối với tình hình hiện tại. Sử dụng TSH cố định vi sinh vật đã có nhiều nghiên cứu trước đây chỉ ra được những ưu điểm vượt trội của nó. Không chỉ phân hủy hợp chất ô nhiễm mà TSH cố định vi sinh vật còn làm tăng khả năng sinh vi khuẩn có lợi, góp phần vào việc hỗ trợ xử lý ô nhiễm môi trường.

Trong tình hình hiện tại, việc tìm ra một phương pháp phù hợp về cả mặt hiệu quả cũng như kinh tế là rất cần thiết, do đó việc tiến hành nghiên cứu đề tài ***“Nghiên cứu tăng cường khả năng phân hủy hợp chất đa vòng thơm bởi xạ khuẩn cố định trên than sinh học định hướng ứng dụng trong xử lý môi trường”*** được thực hiện với mục đích xác định khả năng phân hủy chất hữu cơ đa vòng thơm của chủng xạ khuẩn được cố định trên than sinh học, từ đó định hướng nghiên cứu, phát triển và ứng dụng trong xử lý môi trường, đặc biệt là ô nhiễm các hợp chất ô nhiễm hợp chất hữu cơ đa vòng thơm.

## **2. Mục đích nghiên cứu**

Sàng lọc, xác định xạ khuẩn có nguồn gốc từ đất ô nhiễm chất độc hóa học có khả năng phân hủy hợp chất ô nhiễm đa vòng thơm phenanthrene; và khảo sát khả năng tăng cường xử lý sinh học bởi tổ hợp xạ khuẩn cố định trên TSH.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

- Nghiên cứu khả năng cố định xạ khuẩn lên TSH.
- Nghiên cứu khả năng phân hủy hợp chất ô nhiễm đa vòng thơm của chủng xạ khuẩn.
- Nghiên cứu khả năng phân hủy hợp chất ô nhiễm đa vòng thơm bởi xạ khuẩn được cố định trên than sinh học.

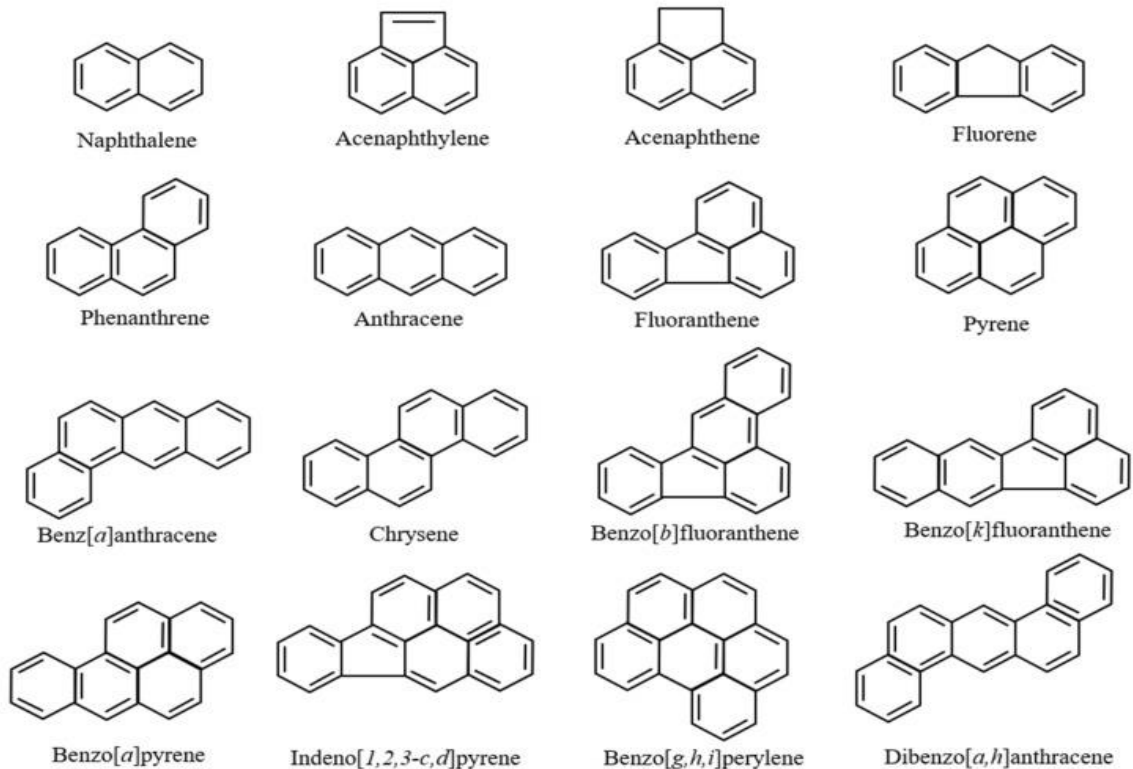
#### **4. Những đóng góp của luận văn**

Xác định được tiềm năng ứng dụng vào xử lý các chất ô nhiễm đa vòng thơm thông qua khả năng phân hủy phenanthrene của các chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 được phân lập từ đất ô nhiễm chất độc hóa học dioxin tại sân bay Aso, tỉnh Thừa Thiên Huế. Chủng X3 cho thấy khả năng phân hủy phenanthrene cao và đã chứng minh được vai trò tích cực của TSH trong quá trình phân hủy phenanthrene.

## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Hợp chất ô nhiễm hydrocacbon đa vòng thơm (PAHs – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)

Các chất hydrocacbon đa vòng thơm (PAHs – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) là các hợp chất hữu cơ có chứa ít nhất hai vòng benzen và có thể có thêm các nhóm thế. Các hợp chất PAHs thường được hiểu là những hợp chất chỉ chứa hai loại nguyên tố là cacbon và hidrohydro. PAH được chia làm hai nhóm: nhóm hợp chất có khối lượng phân tử thấp là các PAH có số vòng benzen nhỏ hơn 4 vòng, và nhóm hợp chất có khối lượng phân tử cao là các PAH có từ 4 vòng trong phân tử trở lên [1]. Naphthalene được coi là dạng đơn giản nhất của PAH theo US EPA Hoa Kỳ và US CDC [2]. Nhưng cũng có tác giả cho rằng PAH đơn giản là dạng ba vòng phenanthrene và anthracene [3]. Các PAHs được phân tích phổ biến thể hiện trong hình 1.1.



**Hình 1.1:** Cấu trúc hóa học của 16 PAHs đại diện theo quyết định của Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ (US EPA) [2]

#### *Phenanthrene*

Phenanthrene là một hydrocacbon thơm đa vòng bao gồm ba vòng benzen hợp nhất. Tên 'phenanthrene' là một hỗn hợp của phenyl và anthracene. Ở dạng nguyên chất, nó được tìm thấy trong khói thuốc lá và được biết đến kích thích, nhạy cảm ánh sáng với ánh sáng. Phenanthrene hiện diện dưới dạng bột trắng có màu xanh huỳnh quang [4].

Phenanthren gần như không hòa tan trong nước nhưng hòa tan trong hầu hết các dung môi hữu cơ có độ phân cực thấp như toluene, cacbon tetraclorea, ether, chloroform, axit axetic và benzen.

Phenanthrene được sử dụng trong tổng hợp các chất hữu cơ như thuốc nhuộm, thuốc trừ sâu,.. và là một trong những tác nhân gây ô nhiễm khó phân hủy nhất. Lựa chọn phenanthrene đại diện cho hợp chất ô nhiễm đa vòng thơm nhằm nghiên cứu xem vi khuẩn cố định TSH có thể tăng cường, thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học phe trong đất hay không và sự kết hợp giữa TSH và vi khuẩn có tác dụng hỗ trợ nhau trong quá trình loại bỏ sinh học hiệu quả của phenanthrene hay không. Điều này sẽ góp phần vào nghiên cứu và khắc phục đất ô nhiễm PAHs.

## **1.2. Độc tính của PAHs**

Tính độc của PAHs đã được con người biết đến từ những năm 30 của thế kỷ XX, khi Hieger và Cook cùng những cộng sự khác nghiên cứu và thấy tinh thể benzo(a)pyren màu vàng gây khối u ở động vật thí nghiệm. Với con người, PAHs có thể là tác nhân gây đột biến dẫn đến ung thư. Các PAHs có khối lượng phân tử nhỏ, cấu tạo phân tử chỉ có một, hai, ba vòng thơm là rất độc, trong khi các PAHs có khối lượng phân tử lớn lại có thể gây độc ở mức độ gen, hoặc gây ra đột biến, bởi chúng có khả năng gắn vào các phân tử ADN, ARN, hoặc protein, gây nên những biến đổi ở mức phân tử. Khi xâm nhập vào cơ thể, PAH nhanh chóng xâm nhập vào các mô mỡ và tiếp tục di chuyển đến những cơ quan khác. Tùy từng loại PAH với liều lượng và thời gian tác động mà mức độ ảnh hưởng đến cơ thể khác nhau [5]. PAH là một trong những chất hữu cơ ô nhiễm phổ biến nhất. Ngoài các nguồn gốc từ môi trường do quá trình đốt nhiên liệu, PAH cũng được tìm thấy trong thực phẩm. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng thức ăn nhiễm PAH đến từ ngũ cốc, các loại dầu và chất béo. Một lượng nhỏ đến từ rau và thịt nấu chín. Các hợp chất PAH đã được xác định là tác nhân gây ung thư, gây đột biến, và quái thai [4]. Trong số các PAH, người ta đặc biệt chú ý đến benzo[a]pyren vì tính độc hại của nó. Benzo[a]pyren là một thành phần có trong khói thuốc lá, và là một trong những nguyên nhân dẫn đến ung thư phổi. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh benzo[a]pyren có thể chuyển hóa thành các loại oxit với sự xúc tác của phức hệ cytochrome P<sub>450</sub>, mà những oxit này có thể phản ứng với các ADN gây đột biến [4].

## **1.3. Các nguồn phát sinh PAHs**

### **1.3.1. Nguồn tự nhiên**

Chất này chủ yếu tìm được trong tự nhiên như nhựa đường hay qua quá trình biến đổi thành các loại như than, dầu, thông qua các quá trình trầm tích, núi lửa phun trào. Ngoài ra, PAH có thể phát sinh từ việc đốt cháy không hoàn toàn các chất hữu cơ trong hàng loạt đám cháy rừng tự nhiên [5].

### 1.3.2. Nguồn nhân tạo

Các nguồn phát thải do con người gây ra là yếu tố chính quyết định ô nhiễm PAH. Quá trình đốt cháy không hoàn toàn là nguồn phát thải PAH chính bởi các hoạt động công nghiệp khác nhau như đốt rác thải, sản xuất sắt thép, sản xuất nhôm, sản xuất xi măng, than đá, thuốc nhuộm, công nghiệp nhựa đường, sản xuất lốp cao su, sản xuất thuốc diệt nấm và thuốc trừ sâu, khí thải từ các nhà máy lọc dầu và sản xuất điện [6]. Các nguồn phát thải công nghiệp khác là khí hóa than, lò hồ quang điện, lò oxy, động cơ diesel và động cơ chạy bằng xăng của các máy móc lớn [7]. Các nguồn phát thải di động bao gồm khí thải từ nhiều phương tiện như máy bay, tàu thủy, tàu hỏa và các phương tiện giao thông đường bộ [8].

## 1.4. Ảnh hưởng của PAHs

### 1.4.1. Ảnh hưởng đến con người

Độc tính của PAHs phụ thuộc vào cấu trúc, với các đồng phân khác nhau độc tính thay đổi từ trạng thái ít độc đến cực kỳ độc hại. Vì vậy, PAHs có thể gây ung thư với mức độ ít hoặc nhiều. Một trong những hợp chất PAHs, benzo [a] pyrene, đáng chú ý là chất gây ung thư hóa học đầu tiên được phát hiện (và là một trong nhiều chất gây ung thư được tìm thấy trong khói thuốc lá). Cục bảo vệ môi trường Mỹ (EPA) đã phân loại bảy hợp chất PAHs là chất có thể gây ung thư cho con người: Benz[a]anthracen, benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, chrysene, dibenz[a,h]anthracen, và indeno [1,2,3-cd] pyrene [9]. Các PAHs gây ung thư là benz[a]anthracen và chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo[g,h,i]perylene, coronene, dibenz[a,h]anthracen (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>), indeno[1,2,3-c,d]pyrene (C<sub>22</sub> H<sub>12</sub>) và ovalene [9].

PAHs gây ra một số biểu hiện ảnh hưởng ngắn đến sức khỏe như buồn nôn, nôn, kích ứng mắt và tiêu chảy cũng như các ảnh hưởng lâu dài đến sức khỏe như giảm số lượng hồng cầu, tổn thương gan và thận và tăng nguy cơ mắc bệnh hen suyễn, bệnh tim mạch và ung thư phổi ở trẻ sơ sinh, trẻ em, người già và phụ nữ mang thai [10].

### 1.4.2. Ảnh hưởng đến môi trường sinh thái

Đối với sinh vật dưới nước, PAHs gây ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trao đổi chất và quá trình oxy hóa. Đất bị ô nhiễm nặng PAHs cũng gây tác động xấu đến động vật không xương sống trên cạn như sinh sản, hình thành khối u [11].

Động vật có vú có thể hấp thụ PAHs bằng nhiều con đường khác nhau như hít phải, tiếp xúc qua da hoặc nuốt phải. Mặt khác, thực vật có thể hấp thụ PAHs từ đất qua rễ và di chuyển tới các bộ phận khác nhau của cây. Tỷ lệ hấp thụ phụ thuộc vào nồng độ, độ hòa tan trong nước và trạng thái lý hóa của đất. Tuy nhiên, một số loài thực vật có chứa chất chống lại độc tố của PAHs.

Các loài thực vật khác có thể tổng hợp PAHs và dùng chúng như một hormone tăng trưởng [11].

## 1.2. Tổng quan về than sinh học (TSH)

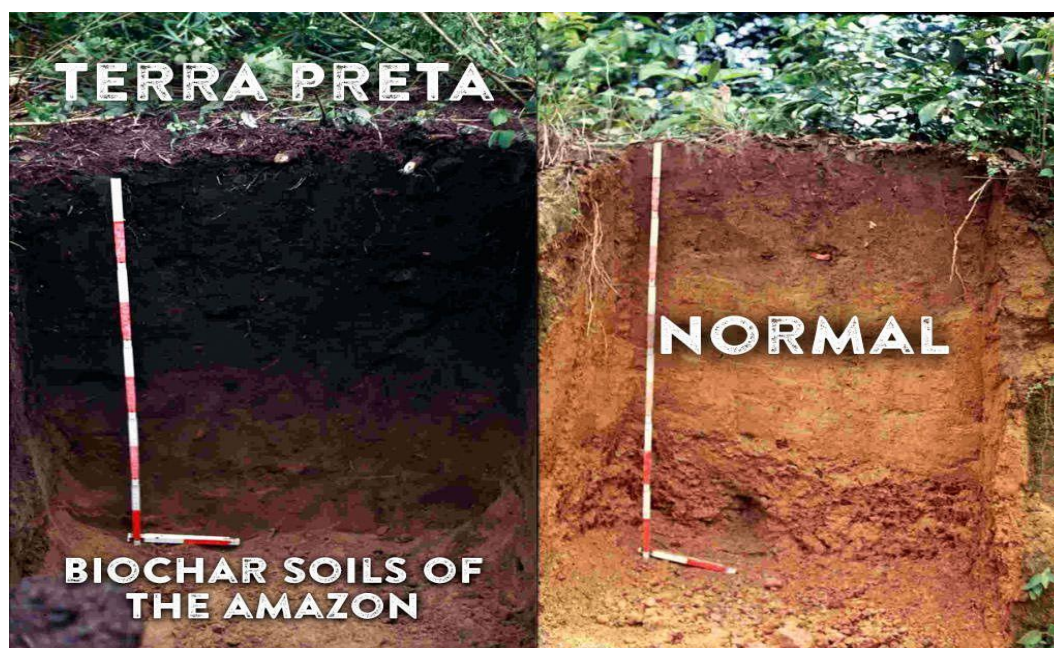
### 1.2.1. Giới thiệu chung

#### 1.2.1.1. Lịch sử hình thành

Cách đây 7000 ngàn năm ở khu vực sông Amazon người bản địa ở đây đã tạo ra được một lớp đất đen giúp nâng cao năng suất và lưu giữ độ màu mỡ của đất. Sau này những người định cư Châu Âu gọi lớp đất này là Terra Preta [12].

Lớp Terra Preta này được tạo ra từ việc người bản địa Amazon thải ra môi trường đất các chất thải sinh hoạt như: thức ăn, xương động vật, chất thải, đồ gốm vỡ,... trải qua quá trình phân hủy lâu dài chúng đã tạo ra một lớp đất đen đem lại sự màu mỡ cho cây trồng của người bản địa [12].

Các nhà khoa học hiện đại đã nghiên cứu thành phần của lớp đất này và nhìn thấy những tác dụng vô cùng quý báu của nó đối với nông nghiệp. Hiện nay, con người đã tạo ra được TSH, một loại than sinh học mà sau một thời gian được chôn dưới đất nó sẽ phân hủy và cùng với môi trường xung quanh tạo ra lớp Terra Preta.



**Hình 1.2:** Sự khác nhau giữa đất chứa lớp Terra Preta và đất thường [12]

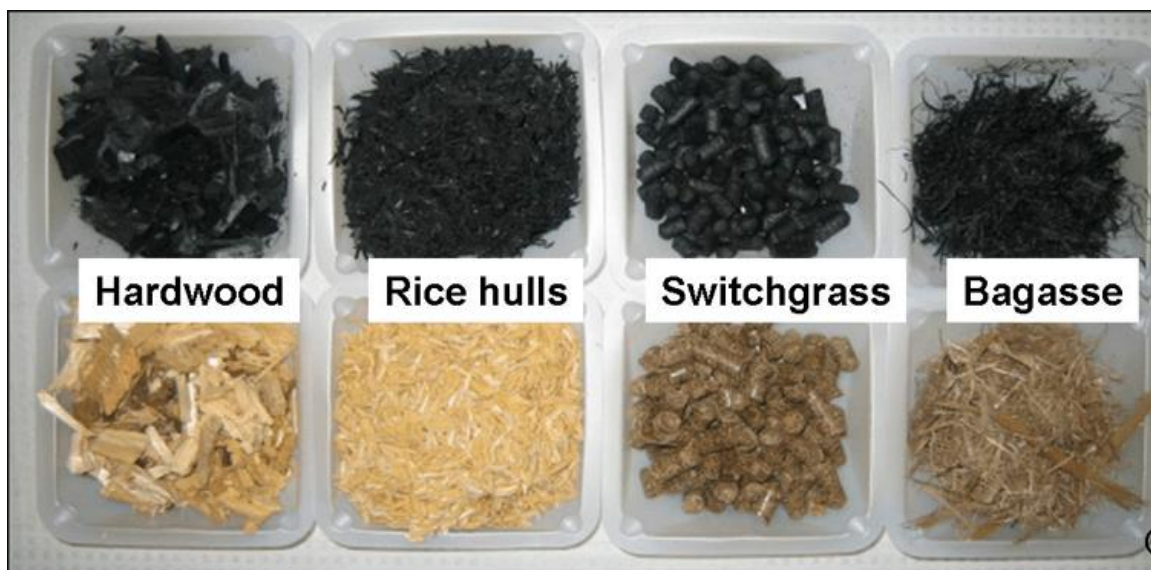
#### 1.2.1.2. Khái niệm

TSH hay còn được gọi là TSH là một chất giống than củi được tạo bằng cách đốt chất hữu cơ từ chất thải nông nghiệp và lâm nghiệp (hay còn gọi là sinh khối) trong một quy trình được kiểm soát gọi là nhiệt phân và được ứng dụng để cố định cacbon nhằm giảm thiểu khí CO<sub>2</sub> vào khí quyển [13]. Trong quá trình nhiệt phân, các vật liệu hữu cơ như vỏ trấu, dăm gỗ, rác lá hoặc thực



vật chất sẽ được đốt trong thùng chứa rất ít oxy. Khi vật liệu cháy chúng thải ra rất ít hoặc không có khói gây ô nhiễm. Trong quá trình nhiệt phân, vật liệu hữu cơ được chuyển thành TSH, một dạng cacbon ổn định không thoát ra ngoài khí quyển. Năng lượng hoặc nhiệt sinh ra trong quá trình nhiệt phân có thể được thu giữ như một dạng năng lượng sạch.

Sản phẩm tạo bởi sự nhiệt phân của nguyên liệu sinh học trong điều kiện nồng độ khí O<sub>2</sub> thấp hoặc hoàn toàn không có. Thông thường quá trình nhiệt phân sinh khối cho ra 20% TSH, 20% khí tổng hợp dùng làm nhiên liệu và 60% dầu sinh học thay thế dầu mỏ trong sản xuất các vật dụng như đồ nhựa. Nhưng khi cần khối lượng lớn để cải tạo đất, người ta thay đổi cách đốt chậm hơn để có tỷ lệ TSH lên trên 50% [14]. Điều khác biệt giữa TSH với than củi là mục đích chính sử dụng của nó, nó được sản xuất như một chất phụ gia cho đất, chủ yếu để cải thiện lưu giữ chất dinh dưỡng và lưu trữ cacbon. TSH là chất ổn định vững chắc và giàu cacbon, do đó, có thể được sử dụng để khóa cacbon trong đất. Sự quan tâm về TSH ngày càng tăng vì những lo ngại về biến đổi khí hậu gây ra bởi lượng khí thải cacbon dioxide (CO<sub>2</sub>) và các khí nhà kính khác.



**Hình 1.3:** Một số dạng TSH được sản xuất từ các nguyên liệu khác nhau [14]

(Từ trái qua phải: Cây phong, vỏ trấu, cỏ Switch, bã mía)

### 1.2.2. Nguyên liệu sản xuất than sinh học

Sản xuất TSH được mô hình hóa sau khi tìm hiểu các quá trình bắt đầu từ hàng nghìn năm trước ở lưu vực sông Amazon. Người ta cho rằng lửa từ việc nấu ăn và đốt rác bếp cùng với việc cố ý đặt than vào đất dẫn đến các loại đất có độ màu mỡ và hàm lượng cacbon cao. Các loại đất này tiếp tục “giữ” lại cacbon và vẫn còn rất giàu dinh dưỡng, thậm chí còn được đào lên và bán dưới hình thức các chậu đất tại thị trường Brazil.

Do lợi ích mà TSH mang lại mà từ đó đến nay các nhà khoa học đã không ngừng nghiên cứu và tìm ra rất nhiều các nguồn nguyên liệu để sử

dụng  
trong sản xuất TSH.

TSH là một chất rắn xốp được tạo ra từ nhiều loại nguyên liệu sinh khối. Nó có nhóm chức bề mặt âm và cấu trúc xốp [15]. TSH với nhiều mức độ hemicellulose, cellulose và lignin khác nhau có thể có nhiều đặc tính hóa lý khác nhau [15]. Ngày nay, người ta thể sử dụng bất kỳ vật liệu sinh khối thực vật, đem đi nhiệt phân trong điều kiện thiếu hoặc không có oxy để tạo ra TSH, sinh khối đó có thể là dư lượng cây trồng, gỗ và chất thải gỗ, hoặc các vật liệu hữu cơ khác nhau. Tuy nhiên, một số vật liệu có nguồn cung cấp rất phong phú cũng như giá thành rẻ đã được đề xuất làm nguyên liệu sinh khối cho TSH, bao gồm vỏ trấu, vỏ hạt, dư lượng phân bón và dư lượng cây trồng, những nguyên liệu này được sử dụng rộng rãi hơn. Cũng có nhiều nguyên liệu khác có tiềm năng sẵn có để sản xuất TSH, trong đó có biowaste (ví dụ như bùn thải, rác thải đô thị, phân gia cầm) và phân compost. Tuy nhiên, sử dụng những loại nguyên liệu này có sự nguy hiểm do có sự tồn tại các thành phần nguy hại (ví dụ như các chất hữu cơ ô nhiễm, kim loại nặng,...).

Về nguyên tắc, bất kỳ vật chất hữu cơ nào cũng có thể nhiệt phân, tuy nhiên mỗi loại nguyên liệu khác nhau thì cho tỷ lệ sản phẩm chất rắn (than) và sản phẩm chất lỏng, chất khí cùng với đặc tính lê hóa của TSH là khác nhau. Do thành phần hóa học cấu tạo nên sinh khối vật chất hữu cơ là thành phần quan trọng trong sản xuất TSH. Theo nghiên cứu của Rajarathnam and Bano năm 1989 lignocellulosic là nguyên liệu hữu cơ phong phú nhất trên trái đất chiếm 50% tổng số sinh khối thực vật và sản xuất ước tính hàng năm là 50 - 109 tấn. Phần lớn các chất thải lignocellulose trước đây thường chỉ được xử lý bằng cách đốt sinh khối, điều này gây lãng phí tài nguyên và ô nhiễm môi trường bởi lượng khí phát thải ra. Hiện nay, người ta chú ý tới việc sử dụng vỏ trấu làm nguyên liệu sản xuất TSH. Cùng với sản lượng thóc gạo ngày càng tăng thì lượng trấu thải ra cũng ngày càng cao, nhất là ở những vùng lúa lớn như Thái Lan, Ấn Độ, Trung Quốc hay như Đồng bằng sông Hồng và Đồng bằng sông Cửu Long ở nước ta. Ngay chỉ ở huyện Cờ Đỏ, trực thuộc thành phố Cần Thơ, lượng trấu thải ra hàng năm lên đến 500.000 tấn. Lượng trấu này nhiều khi không được sử dụng mà được xử lý bằng hai phương pháp là đốt trực tiếp, hoặc đổ thẳng ra sông. Việc này có thể gây ô nhiễm môi trường trầm trọng. Trong khi đó, sử dụng vỏ trấu nhiệt phân thành TSH đem lại nguồn lợi lớn. TSH sản xuất từ vỏ trấu có hàm lượng khoáng cao, đặc biệt là silic. Lượng tro trong TSH có thể lên đến 24% hoặc thậm chí 41% theo khối lượng [16].

### ***1.2.3. Tính chất hóa - lý của than sinh học***

#### ***1.2.3.1. Thành phần cấu tạo***

Cellulose bị nhiệt phân ở nhiệt độ từ 250 - 350 °C khi bị nhiệt phân các tiểu cấu trúc cấu thành cellulose sẽ bị phân cắt và tách ra, hầu hết chúng là những phân tử hữu cơ phân tử thấp nên dễ bay hơi, hay bị phân hủy thành

CO<sub>2</sub>, dẫn đến làm giảm khối lượng đáng kể của sinh khối dưới dạng các chất dễ bay hơi, để lại đằng sau một ma trận C vô định hình cứng chắc. Khi làm tăng nhiệt độ nhiệt phân, tỷ lệ cacbon thơm trong TSH bắt đầu thay đổi theo hướng tăng lên, do việc mất các chất dễ bay hơi và việc chuyển hóa các nhóm ankyr và O-ankyl. Ở khoảng 330 °C, tấm graphene polyaromatic bắt đầu phát triển theo chiều ngang và cuối cùng kết lại. Chính điều này đã làm cho TSH có cấu trúc lớp, độ xốp và diện tích bề mặt lớn mà TSH có được là do quá trình này. Ở nhiệt độ trên 600 °C, cacbon hóa sẽ trở thành chiếm ưu thế. Cacbon hóa đánh dấu sự loại bỏ các nguyên tử không chứa C còn lại và kết quả là tăng hàm lượng C (theo khối lượng của TSH được sản xuất từ gỗ) [17].

### 1.2.3.2. Thành phần hóa học và bề mặt hóa học

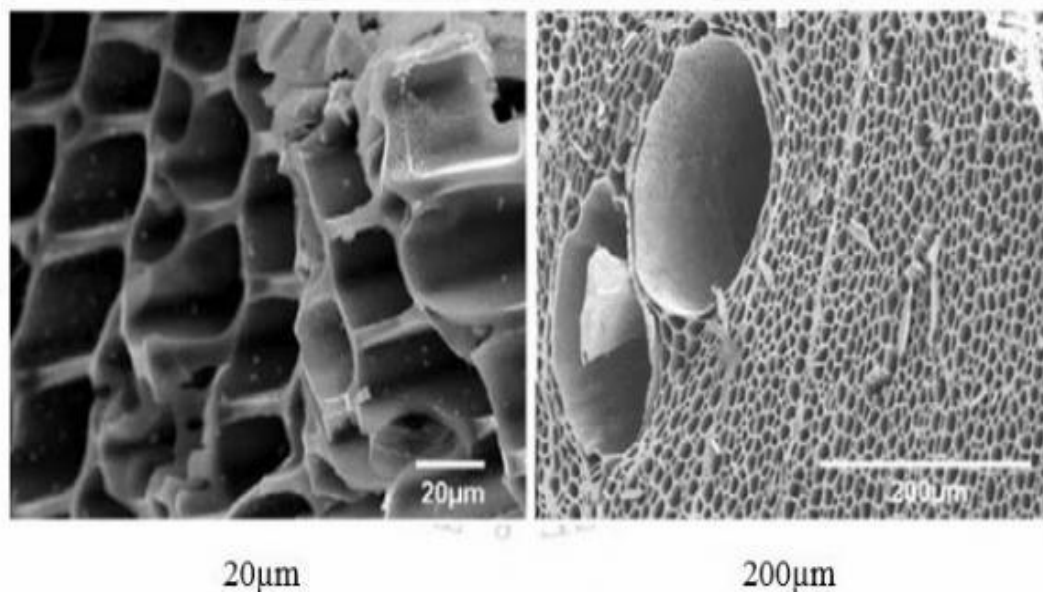
Thành phần TSH rất không đồng nhất, nó chứa cả thành phần bền và không bền [18]. Cacbon, vật chất dễ bay hơi, khoáng chất (tro) và độ ẩm thường được coi như là thành phần chính của nó [17]. Bảng 1.2 tóm tắt phạm vi tỷ lệ tương đối của các thành phần trong TSH được sản xuất từ rất nhiều nguồn vật liệu và các điều kiện nhiệt phân [17]. Tỷ lệ tương đối của các thành phần trong TSH xác định tính chất hóa học, vật lý và chức năng của TSH nói chung [17]. Ví dụ, TSH được tạo ra bằng cách nhiệt phân nguyên liệu gỗ [19] thì vững chắc. Ngược lại, TSH sản xuất từ phế phẩm nông nghiệp (như lúa mạch đen, ngô, vỏ trấu) phân súc vật và rong biển nói chung là tốt hơn nhưng ít bền (sức bền cơ học thấp) do đó chúng giàu dinh dưỡng và tốt cho khu hệ vi sinh vật phân hủy trong môi trường [18]. Hàm lượng tro của TSH phụ thuộc vào hàm lượng tro của các nguyên liệu đầu vào. Cỏ, vỏ hạt, bã rơm rạ và phân thường sản xuất TSH có hàm lượng tro cao trái ngược so với nguyên liệu gỗ [20]. Ví dụ, các TSH được sản xuất từ phân gà có thể chứa 45% tro (theo trọng lượng) [21]. Độ ẩm là một thành phần quan trọng khác của TSH, độ ẩm cao sẽ làm tăng chi phí sản xuất và vận chuyển TSH đối với các đơn vị sản xuất TSH [17]. Giữ thành phần độ ẩm khoảng 10% (theo khối lượng) là điều mong muốn. Để có thể đạt được điều này, cần làm khô nguyên liệu sinh khối trước khi nhiệt phân (đây có thể là một thách thức khi sản xuất TSH).

### 1.2.3.3. Đặc điểm cấu trúc xốp và nhóm bề mặt của than sinh học

TSH có hàm lượng cacbon cao và đặc tính xốp giúp đất giữ nước, dưỡng chất và bảo vệ vi khuẩn có lợi cho đất. TSH được sản xuất bằng cách đốt gỗ hoặc các vật liệu thực vật khác trong buồng hạn chế oxy. Bộ khung cacbon tinh khiết để lại sau quá trình này có diện tích bề mặt rộng với khả năng trao đổi cation rất cao, do vậy khi được thêm vào đất, đặc biệt là loại đất bị thoái do hạn hán và nhiệt độ cao, nó có thể nhanh chóng cải thiện khả năng lưu giữ và sau đó giải phóng các chất dinh dưỡng [14].

TSH có diện tích bề mặt rất lớn và có khả năng trao đổi cation cao, do đó nó có khả năng lưu giữ các chất dinh dưỡng của thực vật như N<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>,... Tính chất xốp của vật liệu cũng có nghĩa là nó chứa được nước và không khí.

Do đó nó cung cấp tất cả các nhu cầu chính cho sự tồn tại của vi sinh vật trong đất, đóng một vai trò quan trọng trong dinh dưỡng thực vật [16].



**Hình 1.4:** Cấu trúc dưới kính hiển vi của TSH [14]

*Cấu trúc xốp của bề mặt TSH:* TSH với sự sắp xếp ngẫu nhiên của các vi tinh thể và liên kết ngang, bên giữa chúng làm cho TSH có cấu trúc lỗ, xốp khá phát triển. Các lỗ rỗng trên bề mặt TSH có cường độ sắp xếp lớn, mang lại giá trị quan trọng lớn hơn so với sinh khối không bị cháy [22]. Chúng có tỉ trọng tương đối thấp (nhỏ hơn  $2\text{g/cm}^3$ ) và mức độ graphit hóa thấp. Cấu trúc vi lỗ xốp của bề mặt quyết định chủ yếu từ bản chất nguyên liệu ban đầu, được tạo ra trong quá trình than hóa và phát triển hơn trong quá trình hoạt hóa TSH.

Cấu trúc xốp của TSH có tác dụng to lớn trong nông nghiệp. Nó có thể chứa một lượng nước lớn, khi bón trên đất cát giúp chúng nâng cao năng lực giữ nước của đất, cải thiện đáng kể độ ẩm đất. Đồng thời nó cũng có khả năng giữ khí rất tốt, khi bón cho đất sét, nó có ảnh hưởng đáng kể đến độ xốp thoáng và khả năng trao đổi khí của loại đất này. Cấu trúc xốp của TSH cũng là nơi hấp phụ hữu cơ, là nơi trú ngụ và nhân sinh khối của các vi sinh vật trong đất. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về ứng dụng TSH trong nông nghiệp, làm rõ các tác động tích cực đến từng loại đất và cây trồng đặc thù cũng như phân tích những hạn chế của TSH từ những loại phế phụ phẩm khác nhau, được tạo thành từ những chế độ nhiệt phân khác nhau. Tổng quan lại các kết quả nghiên cứu này, chúng ta sẽ có bộ giải pháp hoàn chỉnh giúp ứng dụng TSH trong thực tế đạt hiệu quả cao, phù hợp với đặc điểm của từng vùng, miền. Có thể kể đến các nghiên cứu như: Abrishamkesh và cộng sự (2015) đã chứng minh TSH có tác động tích cực khi đưa vào đất phèn, giúp tăng hàm lượng cacbon hữu cơ trong đất, khả năng trao đổi cation, kali giữa đất và cây trồng, đồng thời tăng độ phì nhiêu cho đất, và kích thích sự tăng

trường cây họ đậu. Còn Satriawan và Handayanto (2015) đã chỉ ra tác dụng cải tạo đất bạc màu của TSH, mặc dù không làm tăng photpho trong đất nhưng lại làm gia tăng khả năng hấp thụ photpho khi thử nghiệm trên cây ngô [23]. Một số nghiên cứu đã cho thấy, TSH giúp làm tăng đáng kể hàm lượng dinh dưỡng trong đất như P, K, Ca, Mg; giúp cải thiện rõ rệt chất lượng các loại đất có đặc tính khô như đất thịt pha cát và đất thịt pha đất sét [24]. Không chỉ giúp nâng cao chất lượng đất, TSH còn có tác dụng giải độc cho đất, thông qua việc hấp phụ kim loại nặng, tránh làm phát tán xuống nguồn nước ngầm. Theo nghiên cứu của Nigussie và cộng sự (2012), TSH đã hạn chế việc trao đổi và tích tụ crôm trong cây trồng [25].

*Nhóm Cacbon - Oxy trên bề mặt TSH:* Nhóm cacbon - oxy bề mặt là nhóm quan trọng nhất ảnh hưởng đến đặc trưng bề mặt (tính ưa nước, độ phân cực, tính axit,...), đặc điểm hóa lý (khả năng xúc tác, dẫn điện,...) và khả năng phản ứng của các vật liệu này. Thực tế, oxy đã kết hợp thường được biết là yếu tố làm cho than trở nên hữu ích và hiệu quả trong một số lĩnh vực ứng dụng nhất định. Ví dụ, oxy có tác động quan trọng đến khả năng hấp phụ nước và các khí và hơi có cực khác, ảnh hưởng đến sự hấp phụ ion, khả năng bám dính,... Theo Kipling, các nguyên tử oxy và hydro là những thành phần cần thiết của than hoạt tính với đặc điểm hấp phụ tốt, và bề mặt của vật liệu này được nghiên cứu như một bề mặt hydrocacbon biến đổi ở một số tính chất bằng nguyên tử oxy. Bản chất và lượng nhóm oxy - cacbon bề mặt phụ thuộc vào bản chất bề mặt than và cách tạo ra nó, diện tích bề mặt của nó, bản chất chất oxy hóa và nhiệt độ quá trình.

Đối những than có đặc trưng axit - bazơ, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu nguyên nhân và cơ chế than có bản chất axit hay bazơ. Một vài thuyết, ví dụ thuyết điện hóa của Burstein và Frumkin, thuyết oxit của Shilov và trường phái của ông, thuyết pyron của Voll và Boehm đã được đưa ra để giải thích cho đặc trưng axit - bazơ của than. Bây giờ người ta đã chấp nhận rằng đặc trưng axit - bazơ của than là kết quả của quá trình oxi hóa bề mặt, phụ thuộc vào cách tạo thành và nhiệt độ của quá trình oxi hóa.

Dạng nhóm cacbon - oxy bề mặt (axit, bazơ, trung hòa) đã được xác định, các nhóm axit bề mặt là rất đặc trưng và được tạo thành khi than được xử lý với oxy ở nhiệt độ trên 400 °C. Các nhóm chức axit bề mặt này làm cho bề mặt than ưa nước và phân cực, các nhóm này là caboxylic, lacton, phenol.

Tác dụng của nhóm cacbon - oxy trên bề mặt của TSH trong nông nghiệp rất phong phú, trong đó quan trọng nhất là làm cải thiện khả năng hấp phụ, lưu trữ và trao đổi khoáng làm tăng tính đệm, độ phì hiệu dụng của đất, tăng hệ số sử dụng và hiệu quả của phân bón.

#### ***1.2.4. Vai trò của than sinh học***

Than sinh học trong sử dụng làm phân hữu cơ có những yếu tố quan trọng đối với đất, như sau:

- Cung cấp các nguyên tố có lợi cho quá trình phát triển và trưởng thành của cây, cải thiện tính chất vật lý, hóa học của đất, tạo điều kiện thuận lợi kích thích cho vi sinh vật có lợi phát triển.

- TSH không những cải thiện hàm lượng dinh dưỡng dễ tiêu mà còn tăng cả khả năng giữ dinh dưỡng và nước trong đất do các yếu tố này được hấp thụ vào trong các khe hở của TSH. Ngoài việc cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết, trong TSH có các axit humic chứa các hóc môn có khả năng tăng trưởng cây trồng [26]. Một số nghiên cứu còn cho thấy tác dụng của TSH đối với sinh trưởng và năng suất cây trồng còn cao hơn nếu bón kết hợp với phân khoáng [27].

- TSH được cho là có khả năng hấp thu các amoni từ dung dịch đất. Sự cố định đạm lên bề mặt TSH giúp làm giảm lượng đạm bị mất do thấm xuống đất.

- Làm tăng tỷ lệ nitrat hóa ở đất rừng tự nhiên (đất loại này có tỷ lệ nitrat hóa tự nhiên rất thấp).

- Có khả năng làm giảm sự bay hơi amoniac, bởi vì nó làm giảm amoni có trong dung dịch đất và làm tăng pH của đất, cả hai điều kiện giúp không hình thành amoniac và bay hơi. Ngoài ra, TSH được cho là có khả năng xúc tác khử oxit nitơ (khí gây hiệu ứng nhà kính) thành khí nitơ.

- Khử mùi và khử trùng tại các trại chăn nuôi. Người ta có thể sử dụng TSH kết hợp với chế phẩm vi sinh để làm lớp thảm sinh học cho các trại chăn nuôi gia cầm.

- Nâng cao chất lượng đất từ 80% đến 220%, tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng của cây và chống xói mòn cho đất, đặc biệt là đất ở những địa hình không ổn định.

- Làm cho chất thải hữu cơ thối rữa, giải phóng khí CO<sub>2</sub> có hại vào khí quyển, và cho phép cây trồng lưu trữ CO<sub>2</sub> mà nó hấp thụ từ không khí trong quá trình quang hợp, một cách an toàn.

- Than sinh học hấp thu 50% CO<sub>2</sub> từ sự hô hấp của cây để lưu giữ tạo ra các dạng năng lượng, đặc tính này của than sinh học là một hướng đi trong cuộc cách mạng bảo vệ môi trường, giảm thiểu hiệu ứng nhà kính.

- Nhiều nghiên cứu cho thấy khi bón TSH vào đất acid và đất nghèo dinh dưỡng kết hợp với bón phân thì cho năng suất cao hơn so với bón từng thứ riêng lẻ. Điểm chính khi bón TSH vào đất là làm tăng hiệu quả sử dụng phân đạm của cây trồng. Nhiều bằng chứng cho thấy năng suất không đôi khi giảm lượng phân đạm đáng kể đồng thời bón TSH.

- Ở những vùng đất bị nhiễm độc Cyanua do việc khai thác các mỏ kim loại thì bón TSH sẽ góp phần giúp tái tạo và lọc chất độc trong đất.

### 1.2.5. Ứng dụng của than sinh học

TSH là một vật liệu chứa cacbon được điều chế thông qua xử lý nhiệt sinh khối trong nguồn cung cấp oxy hạn chế và được sử dụng cho một loạt các ứng dụng bao gồm quản lý chất thải, giảm thiểu biến đổi khí hậu, cải thiện độ phì nhiêu của đất, sản xuất năng lượng sinh học và xử lý chất gây ô nhiễm.

TSH đã trở nên phổ biến nhờ vai trò và tiềm năng của nó trong cải tạo đất, môi trường và giảm như biến đổi khí hậu. TSH rất giàu cacbon và phụ thuộc vào mục đích sử dụng mà TSH có khả năng cố định cacbon, do đó nó cản trở hoặc ngăn chặn hoàn toàn sự phát tán của cacbon trở lại bầu khí quyển dưới dạng khí CO<sub>2</sub>. Những lợi ích mà TSH mang lại nhiều hơn những gì đã nêu ở trên, tuy nhiên, phạm vi của nó chủ yếu là phục vụ cho các khu vực nông nghiệp và các ngành quản lý chất thải. Hơn nữa, như đã trình bày ở trên, quá trình sản xuất đó còn tạo ra hai loại năng lượng từ một nguồn, đó là nguồn năng lượng tái tạo bền vững.

TSH có thể sử dụng như một sự bổ sung thêm vào đất để tăng sản lượng cây trồng, cải thiện chất lượng nước, duy trì độ ẩm cho đất, giảm lượng phát thải khí nhà kính, làm giảm sự rửa trôi các chất dinh dưỡng, làm giảm độ chua cho đất, cải thiện tính chất vật lý của đất, giảm sự tưới tiêu và các nhu cầu về phân bón. Các tính chất đó phụ thuộc rất nhiều vào các đặc tính của TSH và có thể phụ thuộc vào cả điều kiện của khu vực đó (đất cằn cỗi hay đất tốt).

## 1.3. Tổng quan về xạ khuẩn

### 1.3.1. Giới thiệu về xạ khuẩn

Xạ khuẩn thuộc lớp *Actinobacteria*, phân lớp *Actinobacteridae*, bộ *Actinomycetales*, bao gồm 10 phân bộ, 35 họ 110 chi và 1000 loài trong đó có 478 loài thuộc chi *Streptomyces* và hơn 500 loài thuộc các chi còn lại được xếp vào nhóm xạ khuẩn hiếm [45, 46]. Xạ khuẩn là một nhóm vi sinh vật rất đa dạng trong đó đa số sinh trưởng hiếu khí và tạo khuẩn ty phân nhánh tương tự như nấm. Tên xạ khuẩn (*Actinomycete*) bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp “Actys” (tia) và “mykes” (nấm), ban đầu xạ khuẩn được coi là vi nấm vì chúng sinh trưởng giống với nấm. Xạ khuẩn có cấu trúc tế bào tương tự như vi khuẩn *Gram (+)*, toàn bộ cơ thể chỉ là một tế bào bao gồm các thành phần chính: thành tế bào, màng sinh chất, chất nguyên sinh, chất nhân và các thể ứ nhập [30]. Xạ khuẩn là vi khuẩn G (+) có tỷ lệ G + C cao (> 55%) trong AND.

Xạ khuẩn phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên: trong đất, nước, một phần trong bùn và trong các chất hữu cơ khác, thậm chí trong cả cơ chất mà các vi sinh vật khác không sinh trưởng được. Sự phân bố của xạ khuẩn phụ thuộc vào khí hậu, thành phần đất, mức độ canh tác và thảm thực vật. Chúng sinh trưởng và phát triển tốt ở nhiệt độ 28 - 30 °C, độ ẩm khoảng 40 - 55%. Những

nơi có nồng độ pH kiềm, axit thường ít xạ khuẩn, đặc biệt nơi đất quá kiềm lại càng ít xạ khuẩn.

Xạ khuẩn phân bố chủ yếu trong đất và đóng vai trò rất quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất trong tự nhiên. Theo Waksman, trong một gam đất có khoảng 29.000 - 2.400.000 mầm xạ khuẩn, chiếm 9 - 45 % tổng số vi sinh vật. Chúng sử dụng axit humic và các chất hữu cơ khó phân giải khác trong đất. Nhiều chủng xạ khuẩn có khả năng hòa tan lignin bằng cách sinh các enzyme thủy phân cellulose, hemicellulose và các peoxidase ngoại bào [31].

### ***1.3.2. Một số vai trò của xạ khuẩn trong xử lý môi trường***

Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật phân bố rộng rãi trong đất, chúng tham gia vào các quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ trong đất như cellulose, tinh bột... góp phần khép kín vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên. Đặc tính này còn được ứng dụng trong quá trình xử lý phân hủy rác... Xạ khuẩn cũng được coi là nhóm vi sinh vật có vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực như chăm sóc sức khỏe, dược phẩm... Nhóm này có khả năng sinh tổng hợp đa dạng các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học khác nhau cùng với nhiều loại enzyme có giá trị kinh tế. Laccase được cho là một trong các enzyme có giá trị công nghiệp của xạ khuẩn. Enzyme này từ xạ khuẩn có các đặc điểm nổi trội so với các nguồn khác như khả năng chịu nhiệt, chịu dung môi, độ bền cao [59, 60].

Xạ khuẩn còn đóng vai trò quan trọng trong hệ vi sinh vật của đất ô nhiễm chất độc hóa học, chúng thường được thấy là một trong những nhóm chiếm ưu thế [34]. Xạ khuẩn cho thấy vai trò quan trọng trong quá trình xử lý sinh học chất ô nhiễm do chúng duy trì sự ưu thế trong quá trình xử lý ô nhiễm [35]. Chúng hoạt động như một chất “tẩy rửa môi trường” nhằm làm sạch những vùng đất ô nhiễm cũng như giải phóng các enzyme tiềm năng để thực hiện việc đó. Tuy nhiên, các nghiên cứu về khả năng phân hủy các chất ô nhiễm đa vòng thơm khác chủ yếu tập trung vào các chủng vi khuẩn, số lượng chủng xạ khuẩn được công bố ít hơn nhiều so với các đại diện vi khuẩn. Việc sử dụng các sinh vật trong đất để phân hủy các hợp chất ô nhiễm thành các hóa chất vô hại được gọi là xử lý sinh học. Xạ khuẩn đã được nghiên cứu và nổi tiếng với khả năng xử lý sinh học. Thuốc kháng sinh, hợp chất hóa học, thuốc hữu cơ hay kim loại nặng... được xạ khuẩn xử lý một cách hiệu quả.

#### ***Xạ khuẩn xử lý ô nhiễm PAH***

Dầu mỏ hay dầu thô là một hỗn hợp phức tạp của các hợp chất có trọng lượng phân tử khác nhau và thành phần chứa 30% PAH. Dầu thô chứa nhiều PAH khác nhau tập trung vào các con đường trao đổi chất để phân hủy vi sinh vật. Trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí, các chủng vi khuẩn có thể xử lý, phân hủy PAH một cách hiệu quả và thân thiện với môi trường.

Các xạ khuẩn thuộc các chi vi khuẩn *Mycobacteria*, *Rhodococcus* và *Gordona* đã được nghiên cứu về khả năng phân hủy PAH. Một số xạ khuẩn



mới được nghiên cứu như *Sphingomonas paucimobileis* BA2, *Gordona* sp. BP9, *Mycobacteria* sp. VF1 có thể phát triển trên anthracene, pyrene hoặc fluoranthene là nguồn cacbon duy nhất và PAH khoáng hóa với tối đa bốn vòng [36]. Xạ khuẩn có khả năng chuyển hóa phenanthrene có ở đất ven đường bị ô nhiễm PAHs và hai loại đất bị ô nhiễm PAH cao từ các khu công nghiệp [37]. *Rhodococcus* và *Gordonia* là hai xạ khuẩn có khả năng được lựa chọn để xử lý PAH trong môi trường nuôi cấy lỏng và đất. Chất hoạt động bề mặt sinh học phân hủy phenanthrene khi nuôi cấy trên môi trường chứa glucose, hexadecane và dầu hạt cải ở 30 °C. *Gordonia* sp. APB và *G. rubripertincta* tạo ra nhũ tương từ dầu hạt cải trong khi *Rhodococcus* sp. DSM44126 phân hủy và sử dụng phenanthrene và anthracene như là nguồn cacbon duy nhất.

Các tế bào của *Rhodococcus opacus* 412 và *Rhodococcus rhodnii* 135 thích nghi với phenanthrene và anthracene trên môi trường khoáng rắn. Sự thích nghi sơ bộ của các chủng đã đẩy nhanh quá trình chuyển hóa hydrocacbon đa thơm và tạo điều kiện cho vi sinh vật có khả năng phát triển trên phenanthrene như một nguồn cacbon và năng lượng duy nhất trong môi trường khoáng lỏng. Người ta chứng minh rằng phenanthrene được các chủng khoáng hóa thông qua 7,8-benzocoumarin, 1-hydroxy-2-naphthoaldehyde, axit 1-hydroxy-2-naphthoic, salicylaldehyde, salicylate và catechol thành các chất trung gian của chu trình axit tricacbonic và được chuyển hóa một phần với sự tích tụ các sản phẩm của quá trình monooxy hóa tiếp theo (3-hydroxyphenanthrene và phenanthrene dihydroxyl hóa không ở vị trí *trực giao*). Do sự thích nghi của các chủng với anthracene trên môi trường khoáng rắn, biến thể thu được của chủng *R. opacus* 412 có thể chuyển hóa anthracene trong môi trường khoáng lỏng thành anthraquinone và 6,7-benzocoumarin [38].

### ***Xạ khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu***

Trong những năm qua, đã có nhiều kết quả nghiên cứu về sự phân hủy thuốc trừ sâu bởi xạ khuẩn. Streptomyces và xạ khuẩn không phải Streptomyces thuộc các chi *Arthrobacter*, *Frankia*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Nocardioidea* và *Rhodococcus* là một trong những loại xạ khuẩn có nhiều công bố về khả năng phân hủy thuốc trừ sâu. Những vi sinh vật này thể hiện khả năng phát triển, chuyển hóa và phân hủy một số họ thuốc trừ sâu, bao gồm hợp chất hữu cơ (chlor-pyrifos, dimethoate), organochlorine (endosulfan, lindane, pentachlorophenol, pentachloronitrobenzene, hexachlorobenzene), triazine (atrazine, simazine, terbuthylazine), các hợp chất pyrethroid tổng hợp (deltamethrin, cypermethrin) và benzimidazole (carbendazim). Ngoài ra một số nhóm xạ khuẩn còn có khả năng phân hủy thuốc trừ sâu được sử dụng trong quá trình phân hủy sinh học cho đất bị ô nhiễm thuốc trừ sâu như: *Arthrobacter* sp. phân hủy  $\alpha$ -endosulfan và  $\beta$ -endosulfan lên đến 70% trong 6 tuần [39], Streptomyces vàng HP-S-01 loại bỏ 81,1% cypermethrin và 73,5% 3-PBA sau 10 ngày (thí nghiệm thực địa) [40]. Xạ khuẩn cũng có khả năng kháng và loại

bỏ kim loại nặng. Xạ khuẩn đã được tìm thấy là nhóm chính thứ hai hoặc thứ ba trong đất bị ô nhiễm và do đó, nó được coi là nhóm tiềm năng có thể được sử dụng để làm sạch ô nhiễm kim loại nặng cùng với các vi sinh vật trong đất [41].

### ***Xạ khuẩn phân hủy dioxin***

Chủng *Sphingomonas wittichii* RW1 là loài được nghiên cứu rộng rãi có khả năng phân hủy dioxin dựa trên quá trình đồng trao đổi chất. Chủng vi sinh vật phân lập từ môi trường nuôi cấy được làm giàu và cấy vào mẫu nước lấy từ sông Elbe. Vi sinh vật này thực hiện quá trình dehydroxylation góc và catechol thu được là sản phẩm bị phân hủy bởi chủng *Sphingomonas wittichii* RW1[42]. Saibu và cộng sự phân lập được chủng vi khuẩn phân hủy dioxin từ đất ô nhiễm. Trong số 17 chủng phân lập được, hai chủng có khả năng trao đổi chất tốt hơn đã được chọn lọc và xác định sinh vật là *Bacillus* sp. SS2 và *Serratia* sp. SSA1 và tỷ lệ loại bỏ dibenzofuran được tìm thấy là 93,87% đối với SS2 và 2,8-dichlorodibenzo-furans và 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin tương ứng là 86,22% và 82,30% [43].

### **1.4. Vi sinh vật cố định trên than sinh học ứng dụng trong xử lý ô nhiễm môi trường**

Cấy vi sinh vật vào môi trường bị ô nhiễm là một quá trình được gọi là tăng cường sinh học, đây là một phương pháp có nhiều hứa hẹn trong công cuộc xử lý môi trường. Phương pháp này được cho là vượt trội hơn hẳn so với các quy trình xử lý thông thường. Các vi sinh vật có khả năng phân hủy hoặc loại bỏ các chất gây ô nhiễm khác nhau thông qua các cơ chế khác nhau trong quá trình xử lý sinh học. Tuy nhiên xử lý sinh học bằng vi sinh vật cũng có một số hạn chế nhất định như: nồng độ chất ô nhiễm cao có thể gây độc cho vi sinh vật, sự cạnh tranh với hệ sinh vật bản địa, thiếu dinh dưỡng trong môi trường bị ô nhiễm, sự tồn tại và sống sót của vi sinh vật. Để khắc phục những nhược điểm này, vi sinh vật có thể được cố định trong các nền chất rắn khác nhau như silica, diatomite, bentonite, alginate, hạt nano, zeolit, than sinh học,... mang lại sự ổn định hơn cho quy trình xử lý môi trường, ngoài ra còn cải thiện khả năng thu hồi và tái sử dụng của vật liệu vi sinh vật.

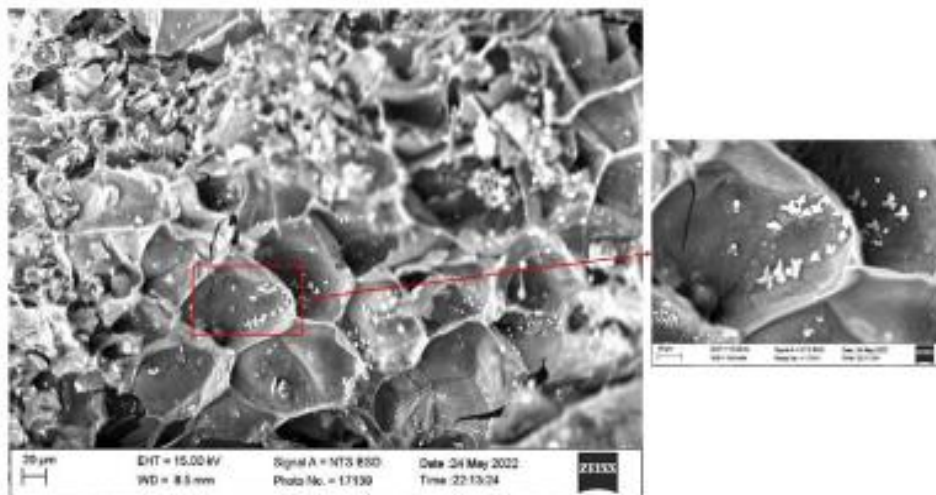
Than sinh học là một loại vật liệu giàu cacbon có độ ổn định cao, có nguồn gốc từ quá trình nhiệt phân các sinh khối khác nhau, nổi bật như một loại vật liệu vận chuyển đầy hứa hẹn cho vi sinh vật. Việc cố định vi sinh vật trên TSH có thể giải quyết hiệu quả vấn đề hấp phụ bão hòa và giải phóng các chất gây ô nhiễm, giúp cải thiện khả năng tái sử dụng của TSH.

Cố định vi khuẩn trên TSH là một phương pháp đầy hứa hẹn để đạt được nồng độ cao và tính ổn định của tế bào vi sinh vật cho một số ứng dụng. Các vi sinh vật có thể được cố định bằng cách hạn chế chúng trong các vật liệu, có thể nâng cao hiệu suất của chúng trong quá trình xử lý học sinh bằng cách giảm độ nhạy cảm với các chất độc hại và các điều kiện bất lợi (ví dụ: pH và nhiệt độ), mang lại sự ổn định cho tế bào vi sinh vật [44]. Sự kết hợp giữa

TSH và vi sinh vật nhằm kết hợp ưu điểm của hai phương pháp này và tránh được một số khuyết điểm khi chỉ sử dụng TSH hoặc vi khuẩn, do đó có thể đạt được hiệu quả phân hủy hợp chất ô nhiễm PAHs nhằm cải thiện chất lượng môi trường và sự sống sót của vi khuẩn ngoại sinh và làm giàu các vi khuẩn đặc biệt [45].

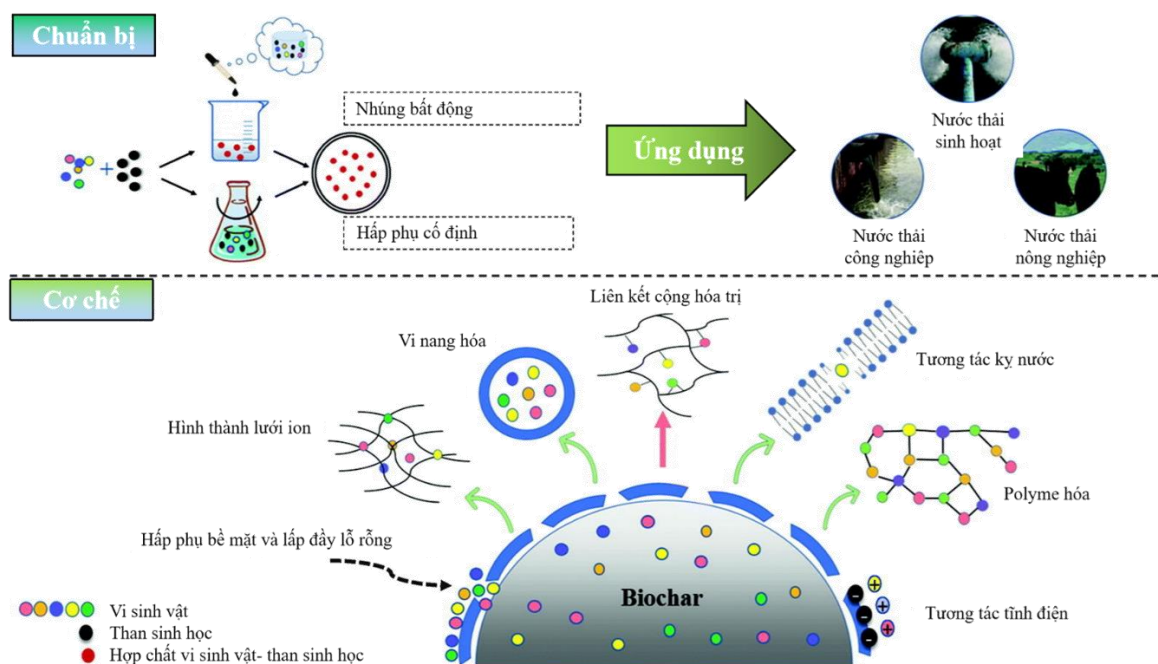
#### 1.4.1. Kỹ thuật cố định vi khuẩn trên than sinh học

Vi khuẩn sau khi được nuôi cấy, tăng sinh, tiếp tục được đưa vào môi trường có chứa TSH để tiếp tục sinh trưởng và phát triển. Từ đó, vi khuẩn được cố định trên bề mặt than sinh học. Sự cố định của vi khuẩn trong TSH bị chi phối bởi cơ chế hấp phụ vật lý và hình thành màng sinh học (hình 1.6). TSH có các nhóm chức năng và đặc tính kỵ nước sẽ thu hút vi khuẩn, dẫn đến hình thành màng sinh học với các nhóm chức liên kết với TSH.



**Hình 1.5:** Ảnh hiển vi điện tử quét SEM sự xâm nhập của vi khuẩn trên bề mặt TSH [46]

Quá trình cố định bao gồm sự liên kết của vi khuẩn với TSH được cho là xảy ra theo hai giai đoạn: hấp thu và hình thành màng sinh học. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự cố định ban đầu của vi sinh vật lên TSH chủ yếu do sự hấp phụ vật lý và lực hút tĩnh điện. Lực hút tĩnh điện phát sinh từ sự tương tác yếu giữa phân tử hữu cơ và các nhóm chức chứa oxy trên bề mặt TSH, trong khi sự hấp phụ vật lý xảy ra thông qua lực Van der Waals và liên kết hydro giữa vi sinh vật và TSH. Cấu trúc xốp của TSH cho phép vi khuẩn bám vào bề mặt bên trong và các lỗ của TSH [46]. Hình 1.6 cho thấy hai giai đoạn cố định vi khuẩn trên TSH.



**Hình 1.6:** Cơ chế TSH cố định vi khuẩn [47]

#### 1.4.2. Ứng dụng vi khuẩn cố định trên than sinh học trong xử lý môi trường

TSH có lợi thế là cung cấp các chất dinh dưỡng thiết yếu như N, P, K để nuôi dưỡng vi sinh vật. Các chất dinh dưỡng này kích thích sự phát triển của chúng, nâng cao tốc độ trao đổi chất và tần cường bài tiết enzyme, từ đó thúc đẩy quá trình phân hủy các hợp chất gây ô nhiễm [47].

Trong lĩnh vực xử lý sinh học bằng than sinh học, vi khuẩn chiếm ưu thế được sử dụng cho mục đích cố định trên TSH trong những nghiên cứu khác nhau. Lý do đằng sau việc kết hợp cố định vi khuẩn trong cấu trúc TSH nằm mục đích bảo vệ vi sinh vật khỏi độc tính tiềm ẩn của các chất gây ô nhiễm trong quá trình xử lý sinh học. Bảng 1.3 tổng hợp một số nghiên cứu loại bỏ chất gây ô nhiễm bằng cách cố định vi khuẩn trên TSH.

**Bảng 1.1:** Sử dụng vi khuẩn cố định trên TSH để loại bỏ hợp chất gây ô nhiễm

Vi khuẩn	TSH	Chất gây ô nhiễm	Kết quả loại bỏ (%)	Nguồn tài liệu
<i>Pseudomonas</i>	Vỏ đậu phộng	Phenol	99%	[48]
<i>Streptomyces violarius</i>	Giảm gỗ	Mangan trong nước	78%	[49]
<i>Mycobacteria gilvum</i>	Rơm rạ	Hydrocacbon đa vòng thơm	62.6%	[50]
<i>Enterobacter asburiae</i> ,	Vỏ	Cadimi và chì	± 50%	[49]

<i>Enterobacter tabaci</i> , <i>Klebsiella variicola</i>	ngô, xơ dừa			
<i>Brevundimonas sp.</i> , <i>Bacillus Firmus</i> , <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> , <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> , <i>Bacillus</i> <i>aquimaris</i>	Rơm rạ	Nước thải nhà máy lọc dầu	> 90%	[44]
<i>Rhodococcus</i> <i>rhodochrous</i> , <i>Bacillus</i> <i>tequilensis</i> , <i>Bacillus</i> <i>aryabhatai</i>	Trấu	Metribuzin trong đất trồng khoa tây	82-96%	[51]
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	Xơ dừa	Nước thải dệt may	91.75%	[52]
<i>Bacillus cereus</i> WHX-1	Vỏ đậu phộng	Crom trong đất	63.38%	[53]
<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> và <i>Sphingobacteria</i>	Cám lúa mì	Hydrocacbon trong dầu mỏ (trong đất)	58.31%	[54]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bột tre	Hydrocacbon đa vòng thơm (trong nước)	97%	[55]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rơm rạ	Acenaphten trong nước	76-78%	[56]
<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Citrobacter sp.</i>	Rơm ngô	Uranium và Cadimi	Uranium 67.4% Cadimi 54.2%	[47]
<i>Alcaligenes faecalis</i> WZ-2	Rơm lúa mì	Tebuconazol trong đất	41%	[57]

Zhang và cộng sự (2023) đã nghiên cứu sử dụng TSH cố định *Sphingobium abikonense* để xử lý đất đồng nhiễm phenanthren - Cu, nghiên cứu cho thấy tốc độ phân hủy phenanthrene cao nhất, đạt khoảng 98%, được phát hiện trong thời gian ủ tương đối ngắn (6 ngày) khi xử lý bằng viên TSH cố định vi khuẩn. Ngoài ra TSH có thể hấp thụ các chất ô nhiễm lên bề mặt và bên trong thông qua các cơ chế khác nhau, do đó làm giảm tác động sinh học của các chất ô nhiễm đối với quần thể vi sinh vật đất và cung cấp chất dinh dưỡng cho các vi khuẩn bản địa trong đất, tạo điều kiện cho vi khuẩn chức năng phát triển để phân hủy các chất ô nhiễm một cách trực tiếp và gián tiếp [58]. Trong nghiên cứu này cũng cho thấy TSH có thể cung cấp chất dinh

duỡng cho vi khuẩn cố định, cũng như làm giảm độc tính của các chất chuyển hóa trung gian hoặc Cu, do đó duy trì hoạt động của vi khuẩn. Không chỉ vậy, các viên TSH vẫn còn nguyên vẹn sau khi ủ trong đất trong 12 ngày, điều này rất quan trọng để duy trì độ ổn định cơ học của chúng nhằm bảo vệ các hoạt động cố định của vi khuẩn.

Wahla và cộng sự (2023) [51] cũng đã chứng minh được TSH cố định vi khuẩn làm giảm nồng độ Metribuzin (MB), một loại thuốc diệt cỏ triazinone được phun rộng rãi để kiểm soát cỏ dại trong nông nghiệp, đã được báo cáo là gây ô nhiễm đất, nước ngầm và nước mặt. Nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả của tập đoàn vi khuẩn MB3R bản địa và cố định bằng TSH trong việc xử lý đất bị ô nhiễm MB cũng như phục hồi thành phần cộng đồng vi khuẩn trong khu vực đất bị nhiễm MB. Khả năng phân hủy MB tại chỗ của MB3R được tăng cường đáng kể khi cố định vào than sinh học. Điều này có thể là do độ xốp và diện tích bề mặt cao của TSH cung cấp cho vi khuẩn cố định một môi trường an toàn trong lỗ chân lông của nó, đồng thời tăng khả năng sống sót và hoạt động của chúng bằng cách tăng cường khả năng cung cấp chất dinh dưỡng và bất hoạt các chất có thể cản trở sự phát triển của vi sinh vật.

Đất bị ô nhiễm bởi các chất ô nhiễm hữu cơ do hoạt động canh tác, quản lý chất thải kém và các hoạt động công nghiệp và nhân tạo. Nhiều chất gây ô nhiễm hữu cơ có khả năng gây đột biến hoặc gây ung thư, và một số khó phân hủy [59]. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), các chất gây ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy nổi tiếng bao gồm biphenyl polychlorin hóa, dibenzo-*p*-dioxin polychlorin hóa, PAH và dibenzofuran polychlorin hóa [60], [61]. TSH đã được quan sát là rất hiệu quả trong việc loại bỏ các chất ô nhiễm hữu cơ tự nhiên và nhân tạo khác nhau. Ngoài ra, TSH có thể làm giảm khả dụng sinh học của hợp chất hữu cơ bằng quá trình hấp thụ và giảm thiểu nguy cơ các chất gây ô nhiễm gây ô nhiễm chuỗi thức ăn của con người và nước ngầm.

### 1.5. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Tại Việt Nam, ứng dụng TSH trong việc xử lý ô nhiễm cũng đã được sử dụng trong ngành nông nghiệp do khả năng cải tạo đất trồng và tăng năng suất của chúng. Nguyễn Khởi Nghĩa cộng sự (2017) đã nghiên cứu chỉ ra hiệu quả phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur trong đất của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong bã cà phê [62]. TSH có khả năng cố định vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-7 trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng. Bổ sung TSH vào trong môi trường nuôi cấy khoáng tối thiểu lỏng chứa 50 ppm hoạt chất thuốc trừ sâu Propoxur giúp gia tăng mật số vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 tự do trong 1 mL môi trường lỏng vào thời điểm ban đầu của thời gian nuôi cấy và tổng mật số vi khuẩn (trong 25 mL môi trường nuôi cấy và trong 1,5 g TSH). TSH rác đô thị có khả năng cố định vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cao hơn so với hai vật liệu TSH còn lại (than củi và than đước). Vật liệu sản xuất TSH khác nhau thể hiện khả năng cố định vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Propoxur, *Paracoccus* sp. P23-

7 khác nhau. Ngoài ra, sự phát triển và phóng thích vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 ra ngoài môi trường nuôi cấy lỏng giữa các vật liệu TSH cũng khác nhau.

Lê Thị Nhi Công và cộng sự (2023) đã nghiên cứu chế tạo thành công chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ vỏ trấu. Kết quả, đã sàng lọc được bốn chủng vi khuẩn gồm *Acinetobacter baumannii* QN01, *Rhizobium* sp. DG2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02. Nhiệt độ lên men phù hợp xác định là 40 °C và độ ẩm của chế phẩm là 40%. Chế phẩm có mật độ vi sinh vật đạt >10<sup>9</sup> CFU/g và hiệu quả xử lý dầu sau 6 tháng bảo quản đạt > 90% trong 7 ngày thử nghiệm với nồng độ hydrocacbon thơm ban đầu là 250 ppm, tỷ lệ chế phẩm xử lý là 10%. Ngoài ra, tác giả và cộng sự đã tạo ra mô hình xử lý quy mô phòng thí nghiệm sử dụng chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu (50 lít) bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu. Hiệu quả thu được của mô hình là > 90% sau 7 ngày thử nghiệm [63]. Việc tạo ra chế phẩm có thể sử dụng cả môi trường đất và môi trường nước. Một trong số bốn chủng vi khuẩn sử dụng để làm chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu này đã được cấp Bằng Sáng chế (số 37596) với tên sáng chế là: “Chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tạo màng sinh học và phân huỷ dầu diezen, toluen, naphthalen, phenol và pyren có trong dầu mỏ”. Các chế phẩm của đề tài đã được thử nghiệm áp dụng để xử lý ô nhiễm dầu tại các khu vực bị nhiễm dầu tại Việt Nam như: Vân Phong, Khánh Hoà, Thường Tín...

## Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu, hóa chất, dụng cụ và thiết bị

#### 2.1.1. Vật liệu, đối tượng nghiên cứu

➤ Chủng xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 có hoạt tính laccase cao được phân lập từ đất ô nhiễm chất độc hóa học tại sân bay Aso, tỉnh Thừa Thiên Huế.

➤ TSH

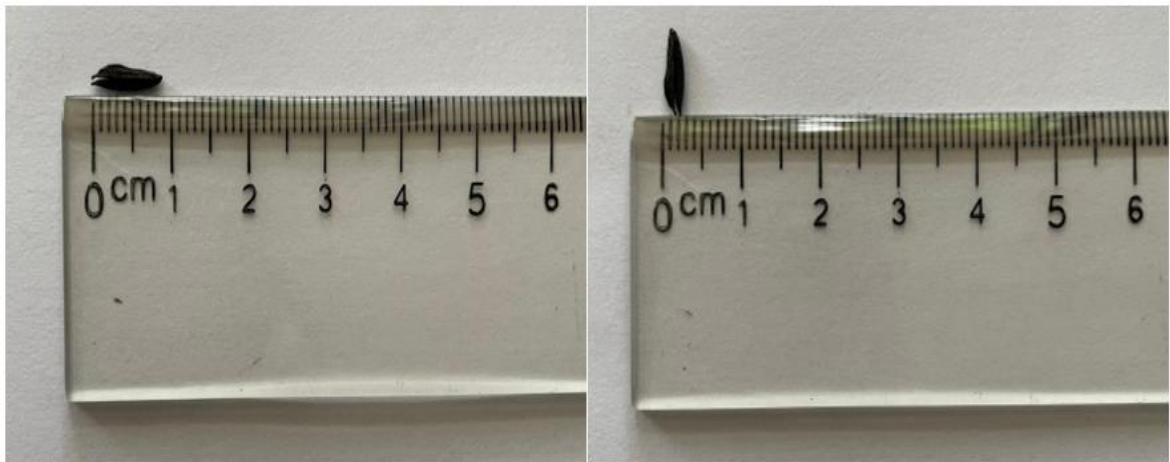
- TSH được sản xuất từ phòng thí nghiệm Trọng điểm lọc hóa dầu, Phạm Ngũ Lão, Hoàn Kiếm, Hà Nội.

- Các chỉ tiêu vật lý khảo sát TSH có nguồn gốc từ vỏ trấu bao gồm kích thước, màu sắc, hình dạng cụ thể như sau:

+ Kích thước: chiều dài 8-9 mm, chiều rộng 1-2 mm, diện tích bề mặt riêng không dưới 120 m<sup>2</sup>/g.

+ Màu sắc: màu đen.

+ Hình dạng: dạng hạt, hình bầu dục và 2 đầu nhọn.



Hình 2.1: Kích thước chiều dài và chiều rộng của hạt trấu

➤ Mẫu đất

Mẫu đất thí nghiệm thu thập tại Hà Nội có pH 5.5, độ ẩm 22,7%.

#### 2.1.2. Hóa chất, môi trường

##### 2.1.2.1. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong tách chiết, phân tích phenanthrene và điều chế 1000 mL môi trường Gause cải tiến phục vụ nghiên cứu được thu thập ở phòng thí nghiệm tại Hà Nội. Thành phần chi tiết được miêu tả trong bảng 2.1 và bảng 2.2.



**Bảng 2.1:** Hóa chất sử dụng trong tách chiết, phân tích phenanthrene

Tên dung môi, hóa chất	Nồng độ	Hãng sản xuất
Phenanthrene (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> )	98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Đức
Acetonitrile	> 99.8%	Deajung Chemicals & Metals CO.,LTD, Hàn Quốc
Hexan [CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> ]	≥ 95%	JHD, Trung Quốc
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	≥ 99.5%	JHD, Trung Quốc

**Bảng 2.2:** Thành phần cho 1000 mL môi trường Gause cải tiến

Tên môi trường	Thành phần	Định lượng	Đơn vị
Gause cải tiến	KNO <sub>3</sub>	2.6	gam
	MgSO <sub>4</sub>	0.45	gam
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	gam
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.56	gam
	NaCl	1	gam
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	gam
	FeSO <sub>4</sub> 1%	200	μL
	Tinh bột	4	gam

## 2.1.2.2. Trang thiết bị

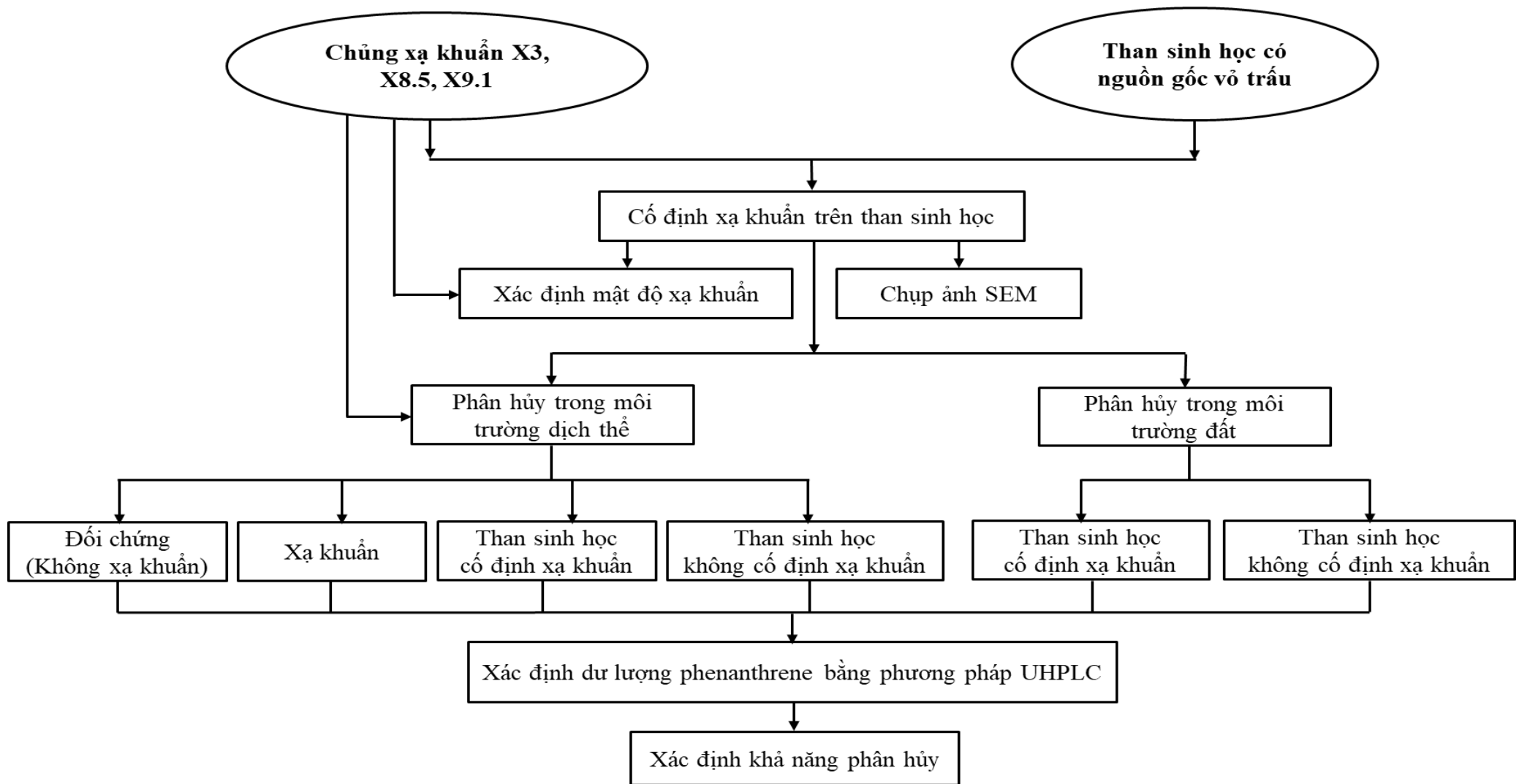
**Bảng 2.3:** Trang thiết bị và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

Tên thiết dụng cụ, thiết bị	Hãng/ nước sản xuất
Cân kỹ thuật BJ 610C	Precisa, Thụy Sĩ
Kính hiển vi điện tử quét S-4800	Hitachi, Nhật Bản
Tủ ẩm và tủ lắc nuôi cấy NB205QF	N – Biotek, Hàn Quốc
Tủ cấy vô trùng AVC-4A1	Esco, Singapore
Máy cô quay chân không Hei-VAP Core XL-Heidolph	Heidolph, Đức
Hệ thống máy sắc ký lỏng Agilent HPLC 1290 Infinity II High-Throughput	Agilent, Mỹ

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Sơ đồ thí nghiệm**

Ba chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ đất ô nhiễm chất độc hóa học dioxin tại sân bay Aso, tỉnh Thừa Thiên Huế là X3, X8.5, X9.1. Sau khi xác định được mật độ chủng giống và đem cố định trên TSH, tiến hành thí nghiệm phân tích sự phân hủy phenanthrene của ba chủng xạ khuẩn trên hai môi trường khác nhau gồm môi trường dịch thể và môi trường đất có chứa chất ô nhiễm là phenanthrene. Đối với môi trường dịch thể, chia thành hai nhóm thí nghiệm là: xạ khuẩn và TSH cố định xạ khuẩn tương ứng với hai nhóm đối chứng là: môi trường dịch không chứa xạ khuẩn và TSH không cố định xạ khuẩn. Đối với môi trường đất gồm một nhóm thí nghiệm là: TSH cố định xạ khuẩn tương ứng là một nhóm đối chứng TSH không cố định xạ khuẩn. Sau khi tiến hành tách chiết, phân tích lượng dư phenanthrene bằng phương pháp UPLC, ta thu được kết quả xác định khả năng phân hủy của ba chủng xạ khuẩn nói trên. Sơ đồ thí nghiệm được thể hiện rõ hơn trong hình 2.2.



**Hình 2.2:** Sơ đồ tóm tắt thí nghiệm

### 2.2.2. Phương pháp xác định mật độ theo phương pháp xác định đơn vị hình thành xạ khuẩn

*Nguyên tắc:* Đơn vị hình thành khuẩn lạc CFU (viết tắt từ của Colony form units) là đơn vị được dùng để ước tính số lượng vi sinh vật trong 1 mẫu thử nghiệm nhất định. Khi kiểm tra vi sinh vật trong một mẫu thử nghiệm bằng cách đếm khuẩn lạc có trên đĩa petri hoặc đĩa môi trường chuẩn bị sẵn (ví dụ đĩa Compact Dry), đơn vị thể hiện khuẩn lạc thường là CFU/mL, CFU/g [64].

*Cách tiến hành:* Trước khi xác định mật độ xạ khuẩn, cần phải pha loãng mẫu vi sinh và cấy mẫu lên đĩa thạch. Để tránh việc các khuẩn lạc phát triển chồng lên nhau cần phải trải qua bước pha loãng này. Sau khi đã ủ mẫu, thực hiện đếm khuẩn lạc thủ công. Trong đó, mỗi chấm trên mẫu chính là một khuẩn lạc. Sử dụng đơn vị tính CFU/mL. Để tính số lượng CFU/mL cần áp dụng công thức sau:

$$A \text{ (CFU/mL)} = N / (n_1.V.f_1 + \dots + n_2.V.f_2)$$

Trong đó: A: Số lượng vi khuẩn có trong 1mL mẫu.

N: Tổng số khuẩn lạc đếm được.

$n_i$ : Số lượng đĩa cấy với độ pha loãng thứ  $i$ .

V: Thể tích mẫu cấy vào từng đĩa (mL).

$f_i$ : Độ pha loãng.

### 2.2.3. Phương pháp chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Phương pháp kính hiển vi điện tử quét (SEM) sử dụng một đầu dò là chùm điện tử (electron), quét trên bề mặt mẫu, xuống độ phân giải thang nm (nanomet): [1 nm =  $10^{-9}$  m] được đo trên máy S-4800. Kính hiển vi điện tử quét (SEM) được dùng để xác minh hiệu quả của việc cố định xạ khuẩn [65].

### 2.2.4. Phương pháp cố định vi sinh vật trên than sinh học

*Nguyên tắc:* Cơ chế cố định vi sinh vật chủ yếu là hấp phụ và hình thành màng sinh học trên than sinh học. Giai đoạn đầu tiên dựa vào quá trình hấp phụ hình thành liên kết Van Der Waals, nhờ vậy vi sinh vật thẩm thấu và cố định vào bề mặt TSH từ đó hình thành màng sinh học. Các đặc tính thuận lợi của quá trình cố định TSH phụ thuộc vào phương pháp nhiệt phân, nguyên liệu thô và tính chất của than sinh học, như diện tích bề mặt, kích thước lỗ rỗng, pH, thế zeta, tính kỵ nước, nhóm chức và chất dinh dưỡng.

*Cách tiến hành:* Sinh khối của 3 chủng xạ khuẩn (X3, X8.5, X9.1) thu sau khi nuôi lỏng được trộn đều cùng với TSH có bổ sung dinh dưỡng là môi trường tăng sinh (môi trường Gause cải tiến). Các thao tác được thực hiện trong box cấy vô trùng.

- TN1: 26g TSH khử trùng + 20ml môi trường tăng sinh + 10ml sinh khối

- TN2: 26g TSH chưa khử trùng + 20ml môi trường tăng sinh + 10ml sinh khô
- ĐC1: 26g TSH chưa khử trùng
- ĐC2: 26g TSH đã khử trùng

Mẫu đếm được ủ ở 30 °C trong trong 14 ngày, sau 14 ngày tiến hành đếm mật độ vi sinh vật có trong các mẫu bằng phương pháp cấy trải trên môi trường Gause cải tiến. Mẫu được ủ ở 30 °C trong 2 ngày sau đó tiến hành đọc kết quả. Xạ khuẩn trên bề mặt TSH được kiểm tra bằng phương pháp chụp ảnh bề mặt với kính hiển vi điện tử quét.

### ***2.2.5. Thiết kế thí nghiệm phân hủy phenanthrene***

Thiết kế thí nghiệm phân hủy phenanthrene sử dụng 3 chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 và xạ khuẩn cố định trên TSH nhằm khảo sát khả năng phân hủy phenanthrene của xạ khuẩn trong môi trường dịch thể và đất có chứa phenanthrene. Các mẫu thí nghiệm và đối chứng được xác định dư lượng phenanthrene, sự khác biệt giữa mẫu thí nghiệm và đối chứng là cơ sở xác định khả năng phân hủy sinh học bởi chủng xạ khuẩn nghiên cứu. Thí nghiệm được lặp lại hai lần.

#### ***Phân hủy phenanthrene trong môi trường dịch thể***

Sử dụng xạ khuẩn phân hủy phenanthrene trong môi trường dịch thể được tiến hành với mẫu không cố định và mẫu được cố định trên than sinh học. Mẫu không cố định được tiến hành như sau: Bổ sung 100 µl dung dịch phenanthrene ( nồng độ chuẩn 15000 ppm) vào các bình tam giác chứa 30 ml môi trường Gause dịch để đạt nồng độ phenanthrene trong môi trường nuôi cấy là 500 ppm. Bổ sung các chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 với mật độ cuối là  $1,6 \cdot 10^7$  CFU/ml lần lượt vào các bình. Mẫu đối chứng được chuẩn bị tương tự nhưng không bổ sung chủng giống. Các mẫu phân tích được ủ ở 30 °C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 2 tuần. Sau đó tiến hành chiết tách thu dư lượng phenanthrene làm cơ sở xác định khả năng phân hủy.

Sử dụng xạ khuẩn cố định trên TSH trong môi trường dịch thể được thiết kế với đối chứng là mẫu có bổ sung TSH không cố định vi sinh vật. Các bước cụ thể như sau: Bổ sung dung dịch chuẩn phenanthrene (nồng độ 15000 ppm) vào các bình tam giác chứa 30 ml môi trường Gause lỏng (nồng độ phenanthrenen trong môi trường là 500 ppm). Bổ sung TSH có gắn các chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 với mật độ cuối là  $1,6 \cdot 10^7$  CFU/ml lần lượt vào các bình. Chuẩn bị tương tự với 2 bình đối chứng còn lại nhưng bổ sung TSH không cố định chủng giống làm đối chứng. Các mẫu phân tích được ký hiệu như trong phụ lục. Các mẫu phân tích được nuôi ở 30 °C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 2 tuần. Sau đó tiến hành chiết tách thu dư lượng phenanthrene.

#### ***Phân hủy phenanthrene trong môi trường đất***

Bổ sung 200  $\mu\text{L}$  phenanthrene (nồng độ chuẩn 15000ppm) vào trong 60g mẫu đất để nồng độ phản ứng đạt 500 ppm, trộn lẫn TSH có gắn các chủng xạ khuẩn và 3g chế phẩm DHS1 (bổ sung dinh dưỡng cho chủng xạ khuẩn). Chuẩn bị tương tự với 2 bình đối chứng còn lại nhưng bổ sung TSH không cố định chủng giống làm đối chứng. Các mẫu phân tích được đánh ký hiệu trên từng bình như trong phụ lục và được đem đi ủ ở 30 °C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 2 tuần. Sau đó tiến hành chiết tách thu phenanthrene còn dư sau quá trình phân hủy.

## **2.2.6. Phương pháp phân tích phenanthrene**

### **2.2.6.1 Phương pháp chiết mẫu thu nhận dư lượng phenanthrene**

#### ***Đối với môi trường dịch thể***

Mẫu nuôi cấy được đem chiết phân lớp với 30 mL dung môi hexane theo tỉ lệ 1:1. Lắc trong 30 phút, gạn, hút pha trong phía trên, lặp lại bước chiết với hexane 3 lần. Gộp dung dịch thu được đem cô quay thu được cao chiết. Định lượng phenanthrene trên UPLC theo phương pháp sau: Cao chiết thu được đem hoà tan với 1ml dung môi acetonitrile; sử dụng cột phân tích ACQUITY UPLC® BEH C18 với các điều kiện như nhiệt độ cột 30 °C; tốc độ dòng 0,1 mL/phút; thể tích bơm mẫu: 2,0  $\mu\text{L}$ ; pha động acetonitrile/nước theo tỉ lệ 7:3; thời gian chạy 40 phút và đo bằng đầu dò DAD bước sóng 254 nm [64]. Nồng độ phenanthrene được xác định dựa vào đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ 10-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sự khác biệt về nồng độ phenanthrene giữa mẫu thí nghiệm và đối chứng là cơ sở xác định khả năng phân hủy sinh học bởi chủng xạ khuẩn nghiên cứu. Thí nghiệm được lặp lại hai lần.

#### ***Đối với môi trường đất***

Dung dịch gồm methanol và  $\text{H}_2\text{O}$  theo tỉ lệ 4:1 đưa vào hòa tan trong mẫu đất (mục đích làm ngừng quá trình phân hủy phenanthrene của chủng xạ khuẩn và kéo phenanthrene còn lại ra khỏi đất và TSH). Sau đó, siêu âm trong vòng 30 phút, lắc trong 30 phút, đem lọc lấy dịch bằng hút gạn và giấy lọc, thao tác được lặp lại ba lần. Dịch lọc thu được đem cô quay chân không để loại bỏ hoàn toàn methanol (dịch thu được đem cho vào ống đông, dùng cồn kè để kiểm tra sự có mặt của methanol bằng cách nhúng vào ống). Mẫu dịch còn lại tiếp tục bổ sung nước cất sao cho thể tích dung dịch đạt 70 ml. Bổ dung hexane với tỉ lệ 1: 1, lặp lại thí nghiệm như đã thực hiện ở môi trường dịch thể.

### **2.2.6.2 Khảo sát khoảng tuyến tính và dựng đường chuẩn phenanthrene trên thiết bị phân tích UPLC**

Khoảng nồng độ chất phân tích phụ thuộc tuyến tính vào chiều cao hay diện tích peak gọi là khoảng tuyến tính. Mối quan hệ tuyến tính giữa nồng độ chất phân tích với tín hiệu đo được gọi là đường chuẩn. Chỉ tiêu đầu tiên của một đường chuẩn đạt yêu cầu là hệ số tương quan hồi quy R phải đạt theo yêu cầu sau:

$$0,995 \leq R \leq 1 \text{ hay } 0,99 \leq R^2 \leq 1$$

Với các điều kiện chạy UPLC đã chọn, chúng tôi tiến hành khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích peak sắc ký vào nồng độ của phenanthrene.

Chuẩn bị 4 mẫu có nồng độ lần lượt là 10; 50; 100; 200  $\mu\text{g/ml}$  của phenanthrene bằng cách pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Tiến hành sắc ký mỗi mẫu ba lần với điều kiện đã chọn.

### 2.2.6.3. Phân tích phenanthrene bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Định lượng phenanthrene trên UPLC với các điều kiện như sau:

- Cột: ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 150 mm
- Detector: DAD bước sóng 254 nm
- Pha động gồm 2 kênh: kênh A là Acetonitrile và kênh B là H<sub>2</sub>O theo chương trình rửa giải gradient như sau:

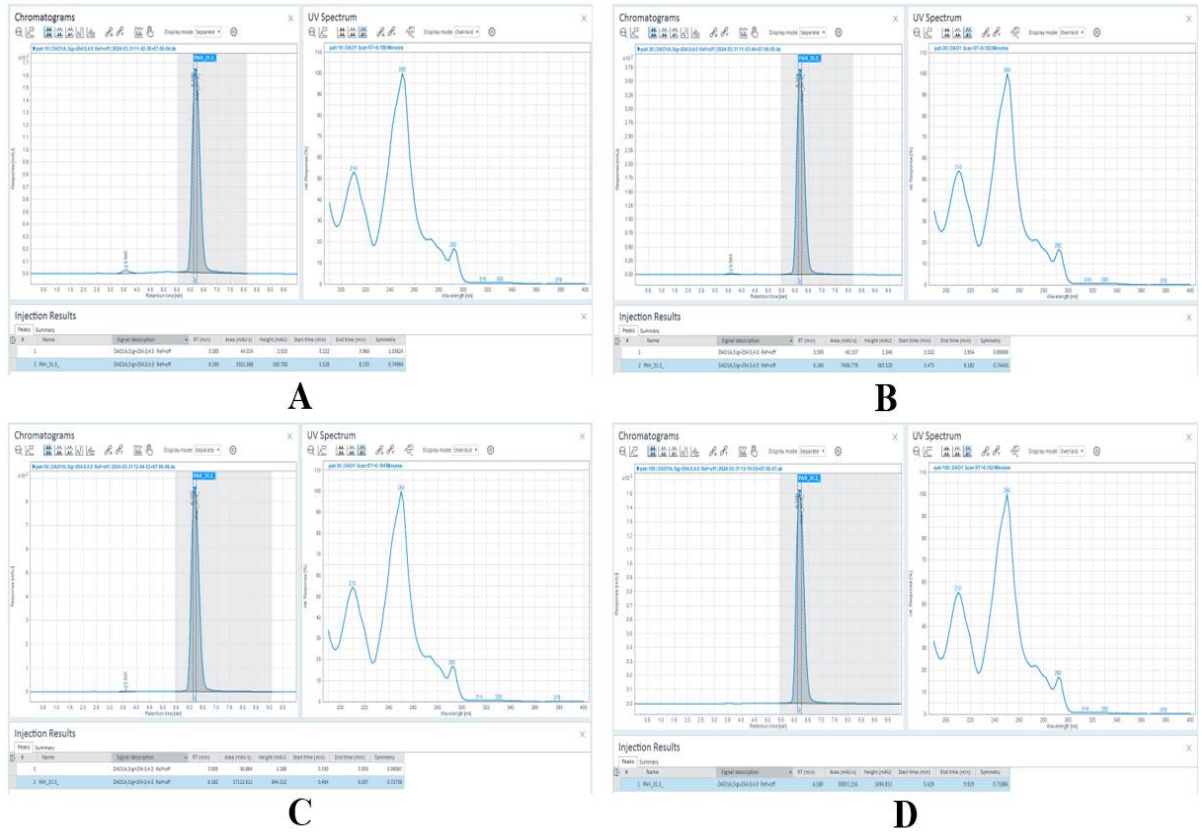
**Bảng 2.4:** Chương trình rửa giải gradient UPLC

Thời gian (phút)	Thành phần pha động (%)		Thời gian lưu (phút)
	Kênh A = Acetonitrile	Kênh B = H <sub>2</sub> O	
0	70	30	40
20	90	10	
25	70	30	
40	70	30	

- Tốc độ dòng: 0,1 mL/phút
- Thể tích bơm mẫu: 2 $\mu\text{L}$

### 2.2.7. Lập phương trình đường chuẩn phân tích phenanthrene

Với các điều kiện chạy UPLC như miêu tả trong mục 2.2.3.8, tiến hành khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích peak sắc ký vào nồng độ của phenanthrene. Khoảng nồng độ chất phân tích phụ thuộc tuyến tính vào chiều cao hay diện tích peak gọi là khoảng tuyến tính. Mối quan hệ tuyến tính giữa nồng độ chất phân tích với tín hiệu đo được gọi là đường chuẩn. Đường chuẩn được sử dụng với hệ số tương quan hồi quy R phải đạt theo yêu cầu sau:  $0,99 \leq R^2 \leq 1$ . Chuẩn bị 5 mẫu có nồng độ lần lượt là 10; 20; 50; 100; 200  $\mu\text{g/mL}$  của phenanthrene bằng cách pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Kết quả đo mỗi mẫu sẽ bao gồm: sắc ký đồ, phổ UV của các peak nhận diện chất có trong sắc ký đồ và các thông số quan trọng khác: thời gian lưu (phút), diện tích peak (mAu), chiều cao của peak. Đường chuẩn phenanthrene được dựng lên dựa vào 5 điểm nồng độ trên, phổ sắc ký của các điểm nồng độ được thể hiện tại hình 3.2.



**Hình 2.3:** Kết quả chạy UPLC ở các nồng độ phenanthrene khác nhau (A. 10 µg/mL; B. 50 µg/mL; C. 100 µg/mL; D. 200 µg/mL)

Dựa vào các thông số: thời gian lưu, diện tích peak của các điểm nồng độ ở trên, có thể thấy thời gian phenanthrene ra ở phút thứ 6,18. Diện tích peak của từng chất tăng tuyến tính theo nồng độ. Khảo sát khoảng tuyến tính của phenanthrene theo bảng 3.4 dưới đây:

**Bảng 3.1:** Khảo sát khoảng tuyến tính của phenanthrene

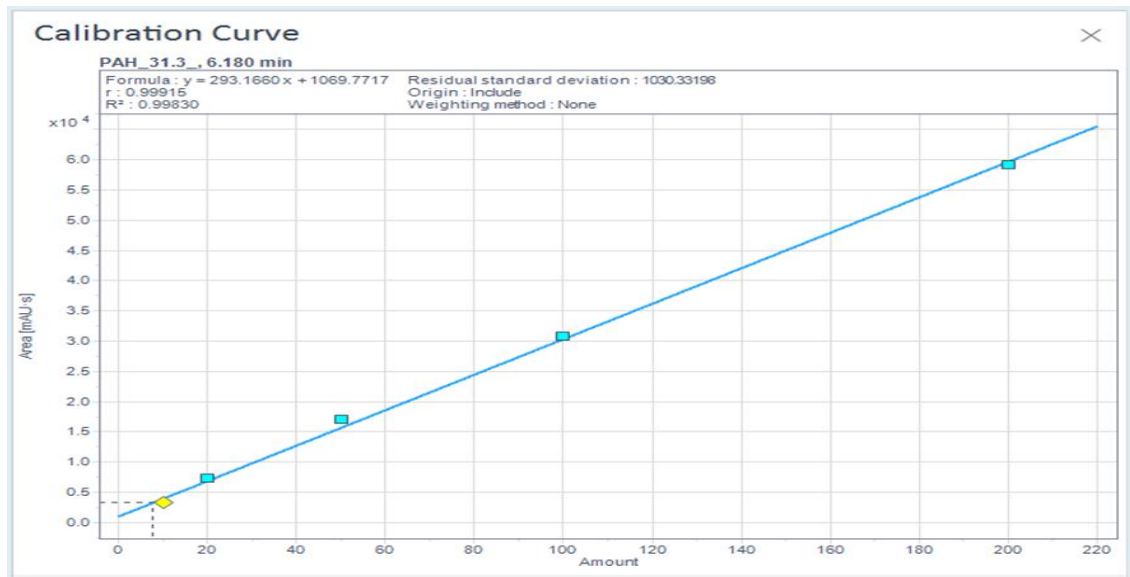
STT	Nồng độ (µg/mL)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (mAU.s)
1	10	6,190	3351,568
2	20	6,184	7406,779
3	50	6,182	17112,611
4	100	6,180	30831,216
5	200	6,182	59119,545

Dựa vào thông số bảng 3.3, ta dựng được đường chuẩn được thể hiện trong hình 3.3.

Trong khoảng tuyến tính vừa xác định, thiết lập phương trình tương quan giữa nồng độ và diện tích peak theo phương trình hồi quy tuyến tính, thu được phương trình đường chuẩn  $y = ax + b$  với  $R^2 = 0.99830$ , do đó phương trình đường chuẩn có dạng:



$$y = 293,1660x + 1069,7717$$



**Hình 2.4:** Phương trình đường chuẩn phenanthrene phân tích trên máy UPLC

### 2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn bằng chương trình Excel Microsoft Win 10 và GraphPad Prism 6.0.

### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Cố định xạ khuẩn trên than sinh học

Các chủng xạ khuẩn được cố định trên hai môi trường là TSH đã khử trùng và TSH chưa khử trùng. Việc khử trùng TSH nhằm mục đích loại bỏ những vi sinh vật lạ làm giảm hiệu suất gắn chủng xạ khuẩn lên TSH cũng như để so sánh hiệu suất gắn chủng lên TSH giữa hai điều kiện khử trùng và không khử trùng.

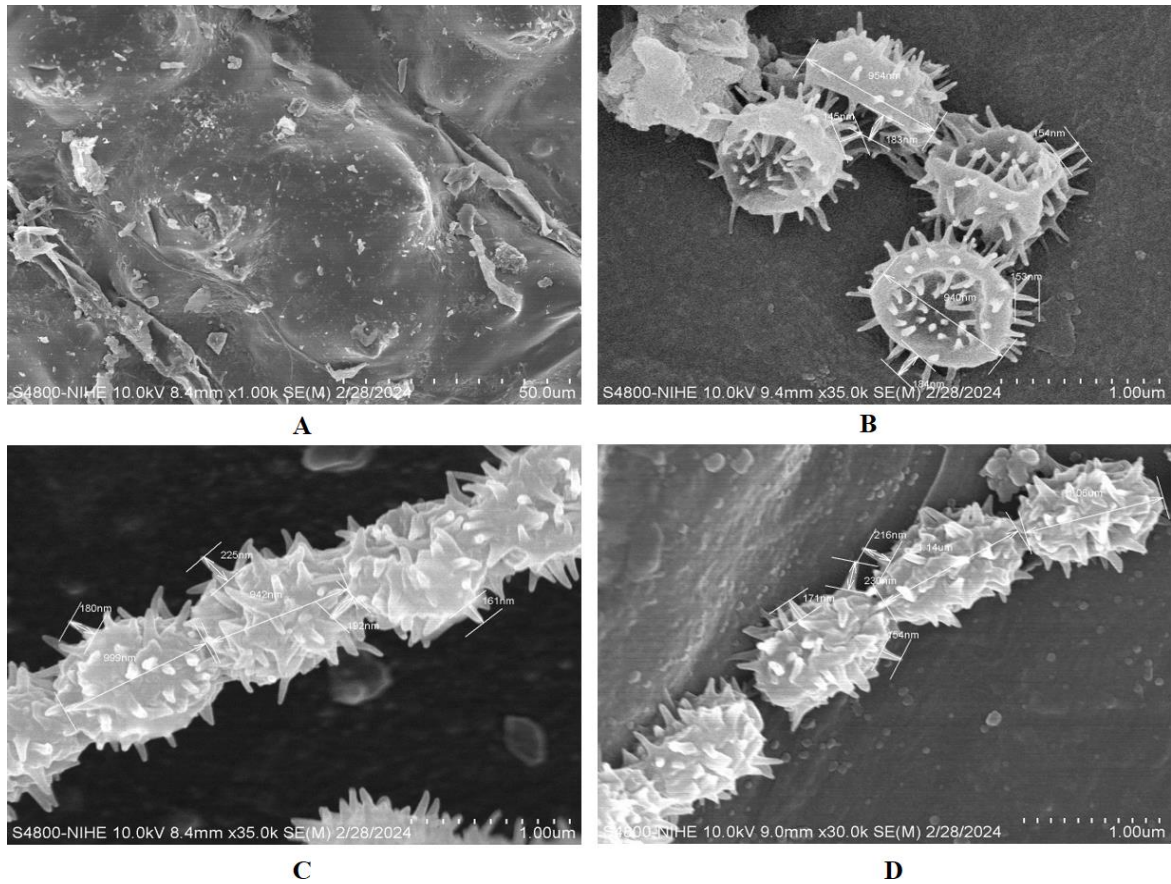
**Bảng 3.2:** Số lượng xạ khuẩn phát triển trên TSH khử trùng và không khử trùng

Chủng	Mật độ khuẩn lạc phát triển trên TSH chưa khử trùng (CFU/ml)	Mật độ khuẩn lạc phát triển trên TSH đã khử trùng (CFU/ml)
<b>X3</b>	$1,7 \cdot 10^7 \pm 0,14$	$1,7 \cdot 10^8 \pm 0,07$
<b>X8.5</b>	$8,6 \cdot 10^7 \pm 0,64$	$1,7 \cdot 10^8 \pm 0,49$
<b>X9.1</b>	$1,3 \cdot 10^8 \pm 0,14$	$1,4 \cdot 10^8 \pm 0,00$

Từ bảng 3.1, dễ dàng nhận thấy đối với nhóm xạ khuẩn gắn trên TSH đã được khử trùng đem lại hiệu suất gắn cao hơn so với nhóm gắn trên TSH chưa được khử trùng. Nhìn số liệu thống kê có thể thấy, chủng X3 và X8.5 có sự thay đổi rõ rệt về hiệu suất gắn chủng. Đối với chủng X3 hiệu suất gắn chủng lần lượt thay đổi từ  $1,7 \cdot 10^7 \pm 0,14$  lên  $1,7 \cdot 10^8 \pm 0,07$  khi chuyển từ cố định trên TSH chưa khử trùng sang cố định trên TSH đã khử trùng. Tương tự đó, đối với chủng X8.5, hiệu suất gắn chủng cũng được tăng lần lượt từ  $8,6 \cdot 10^7 \pm 0,64$  lên  $1,7 \cdot 10^8 \pm 0,49$ . Tuy nhiên, chủng X9.1 lại không thấy sự khác biệt, hiệu suất gắn chủng chỉ giữ nguyên là  $1,4 \cdot 10^8 \pm 0,00$ .

Có thể thấy cấu trúc xốp và bề mặt rộng của TSH giúp vi khuẩn có thể bám chặt trên bề mặt TSH, giữ lại đáng kể số lượng tế bào xạ khuẩn được nuôi cấy, do đó nâng cao hiệu quả xử lý sinh học cũng như bảo vệ vi khuẩn khỏi độc tính tiềm ẩn của các chất gây ô nhiễm trong quá trình xử lý sinh học. Tuy nhiên TSH nên được khử trùng trước khi được tiến hành cố định xạ khuẩn nhằm làm tăng khả năng giữ lại số lượng xạ khuẩn nhiều nhất có thể, tránh làm nhiễm các loài vi sinh vật khác trong quá trình nuôi cấy từ đó giúp cho việc xử lý chất ô nhiễm được hiệu quả hơn và kết quả đánh giá được chính xác.

Ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 được cố định trên TSH nhằm phục vụ cho nghiên cứu phân hủy phenanthrene được kiểm tra sự gắn kết của sinh khối xạ khuẩn trên bề mặt vật liệu TSH bằng phương pháp chụp ảnh SEM, kết quả chụp kính hiển vi điện tử được thể hiện tại hình 3.1.



**Hình 3.1:** Ảnh chụp SEM hình thái cấu trúc của ba chủng xạ khuẩn được cố định trên TSH

(A. Đối chứng; B. X3; C. X8.1; D. X9.1)

Nhìn vào hình 3.2 thấy, bào tử hình cầu có gai nhọn, mọc riêng lẻ hoặc chuỗi bám dính vào nhau phân nhánh thành dạng sợi. Phần gai cắm sâu vào môi trường dinh dưỡng. Kích thước ba chủng xạ khuẩn được thể hiện trong bảng 3.2.

**Bảng 3.3:** Trung bình chiều dài đường kính và chiều dài gai của ba chủng xạ khuẩn

Chủng	Chiều dài đường kính (nm)	Chiều dài gai (nm)
X3	947±9,90	159±17,15
X8.5	970,5±40,31	189.5±26,89
X9.1	1100±56,57	192.75±36,07

### 3.2. Khả năng phân hủy phenanthrene của ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 trong môi trường dịch thể

Trong nghiên cứu hợp tác giữa Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện hóa học môi trường quân sự/Binh chủng hóa học về chủng

xạ khuẩn có khả năng nuôi cấy trong môi trường chứa chất ô nhiễm dioxin và khả năng sinh laccase cũng đã chỉ ra được tiềm năng ứng dụng trong xử lý sinh học của chúng. Trong 26 chủng xạ khuẩn đã được khảo sát, cho thấy 5 chủng sinh laccase với hoạt tính lớn hơn 20 U/L, trong đó cao nhất là chủng X3 (*Streptomyces* sp. XAS3) đạt 468,06 U/L. Trong nghiên cứu này, chủng tôi khảo sát thử nghiệm khả năng phân hủy phenanthrene với chủng tiềm năng X3 trước khi tiến hành các nghiên cứu với nhiều chủng hơn và các điều kiện phân hủy khác nhau. Chủng X3 có khả năng phân hủy phenanthrene lên đến 42,04% sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung phenanthrene. Hàm lượng phenanthrene còn lại trong mẫu nuôi cấy với X3 sau 3 tuần là  $91,74 \pm 3,439 \mu\text{g/mL}$ , trong khi mẫu đối chứng đạt  $158,3 \pm 14,06 \mu\text{g/mL}$ . Kết quả thu được cho thấy tiềm năng ứng dụng vào xử lý phân hủy sinh học các chất ô nhiễm của nhóm xạ khuẩn từ đất ô nhiễm tại sân bay A So, do đó các nghiên cứu sâu hơn đã được tiến hành với 3 chủng xạ khuẩn đại diện là X3, X8.5 và X9.1.

Trước khi tiến hành khảo sát khả năng phân hủy phenanthrene, ba chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường trong 30 mL Gause cải tiến, mật độ hình thành bào tử của ba chủng xạ khuẩn đủ điều kiện để đem đi phân tích và đảm bảo mẫu nuôi cấy không bị nhiễm các loài vi sinh vật khác. Khuẩn lạc hình thành có dạng hình cầu, rời rạc, không mọc chồng lên nhau, lặn dưới đáy bình tam giác. Thí nghiệm được lặp lại hai lần. Kết quả nuôi cấy được thể hiện trong phụ lục hình II.2.

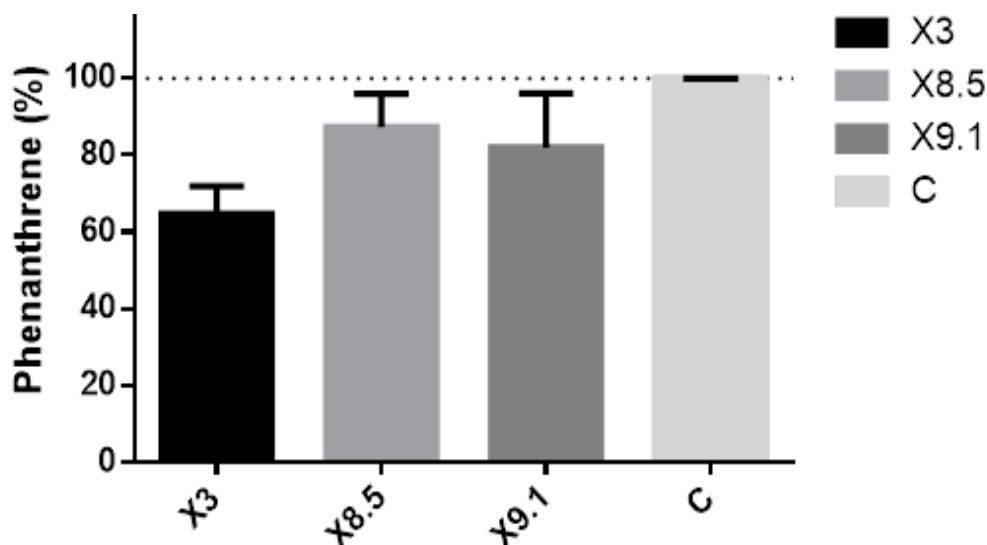
Sau khi nuôi cấy trong môi trường dịch Gause, đảm bảo dịch sau khi nuôi cấy không bị nhiễm, tiến hành đem đi phân tích nồng độ phenanthrene. Dựa vào phương trình đường chuẩn đã lập ra ở trên, tiến hành phân tích UPLC, nồng độ phenanthrene còn lại trong mẫu phân tích được tổng hợp trong bảng 3.4.

**Bảng 3.4:** Nồng độ phenanthrene còn lại và phần trăm phân hủy trong môi trường dịch thể của ba chủng xạ khuẩn ( $\mu\text{g/mL}$ )

Chủng	Nồng độ dư lượng trung bình còn lại ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm phân hủy (%)
X3	$227,23 \pm 24,87$	35,19
X8.5	$287,70 \pm 30,63$	12,68
X9.1	$306,17 \pm 53,11$	17,95
ĐC	$350,62 \pm 0,3$	0

Từ bảng số liệu nêu trên, nhận thấy nồng độ phenanthrene đạt trung bình là  $350,62 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$  ở mẫu đối chứng. Mặc dù có sự phân hủy phenanthrene ở cả ba chủng xạ khuẩn tuy nhiên nồng độ dư lượng trong mẫu phân tích còn

lại khá nhiều. Khả năng phân hủy phenanthrene của ba chủng xạ khuẩn được thể hiện rõ hơn trong biểu đồ hình 3.4.



**Hình 3.2:** Biểu đồ thể hiện phần trăm phân hủy của 3 chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường dịch thể

Nhìn vào biểu đồ hình 3.4, có thể nhận thấy nồng độ phân hủy phenanthrene ở 03 chủng xạ khuẩn là hoàn toàn khác nhau. Tuy giống nhau về cấu trúc nhưng chủng X3 lại cho thấy khả năng phân hủy phenanthrene vượt trội hơn so với chủng X8.5 và X9.1. Theo kết quả nghiên cứu chỉ ra, chủng X3 có khả năng phân hủy là 35,19% trong khi đó 2 chủng X8.5 và X9.1 chỉ phân hủy lần lượt với nồng độ giảm là 12,68% và 17,95%.

Mặc dù khả năng phân hủy phenanthrene trong môi trường dịch thể còn hạn chế tuy nhiên, trong một vài nghiên cứu cũng đã chỉ ra khả năng phân hủy hợp chất ô nhiễm hữu cơ khác của xạ khuẩn trong các điều kiện môi trường khác nhau. Không chỉ phenanthren mà một số hợp chất hữu cơ đa vòng thơm như naphthalene, acenaphthene, fluorene, fluoranthene, pyrene, acenaphthylene... cũng đã được chứng minh rằng bị loại bỏ khỏi môi trường ô nhiễm bởi xạ khuẩn. Những loại xạ khuẩn mới này như *Sphingomonas paucimobilis* BA2, *Gordona* sp.BP9, vi khuẩn *Mycobacterium* sp.VF1 có thể phát triển trên anthracene, pyrene hoặc fluoranthene như nguồn cacbon duy nhất và khoáng hóa PAH với tối đa bốn vòng [65]. *Rhodococcus* và *Gordonia* có khả năng là các loại vi khuẩn *Actinomycetes* được chọn để phục hồi hydrocacbon đa vòng thơm trong nuôi cấy lỏng và đất. Chất hoạt động bề mặt sinh học hoặc phân hủy phenanthrene khi nuôi cấy trên môi trường chứa glucose, hexadecane và dầu hạt cải ở 30°C. *Gordonia* sp. APB và *G. rubripertincta* tạo ra nhũ tương từ dầu hạt cải trong khi *Rhodococcus* sp. DSM44126 có khả năng phân hủy phenanthrene như nguồn cacbon và anthracene duy nhất [66].

Một đặc điểm nổi trội khác của xạ khuẩn là phân hủy thuốc trừ sâu. Chất gây ô nhiễm 4-chlorophenol (4-CP), hợp chất độc hại và khó phân hủy được hình thành từ quá trình clo hóa nước thải, trong các nhà máy bột giấy, từ quá trình phân hủy thuốc diệt cỏ như axit 2,4-dichlorophenoxyacetic và từ quá trình phân hủy kỵ khí của các phenol có hàm lượng clo hóa cao hơn, chẳng hạn như pentachlorophenol và 2,4,6-trichlorophenol. Trong quá trình xử lý sinh học, một số chủng vi khuẩn có thể phân hủy 4-CP. Chủng mới *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. có khả năng phân hủy tới 350 ppm (2,7 mM) nồng độ cao của 4-CP [67].

Mặc dù vậy, khi so sánh với một số vi khuẩn khác về khả năng phân hủy phenanthrene, xạ khuẩn lại không có sự nổi trội trong môi trường dịch. Vi khuẩn *Pseudarthrobacter* sp. L1SW được nghiên cứu là loại bỏ đến 97% trong môi trường dịch nuôi cấy [68] hay vi khuẩn PR-N10 loại bỏ 89% nồng độ phenanthrene trong rễ cây ngậm mặn [69]. Tuy nhiên, theo một số nghiên cứu về khả năng phân hủy phenanthrene của một số loại vi khuẩn khác, kết quả chỉ ra phần trăm phân hủy cũng khá thấp so với xạ khuẩn [69].

Việc sử dụng các sản phẩm gốc xạ khuẩn và nói chung là các sản phẩm gốc vi khuẩn cho các ứng dụng trong môi trường đất có cả ưu điểm và nhược điểm. So với các loại hóa chất nông nghiệp và các phương pháp xử lý vật lý và hóa học khác được sử dụng cho nông nghiệp hoặc phục hồi, khắc phục, các sản phẩm gốc xạ khuẩn là bền vững. Các sản phẩm gốc xạ khuẩn hoàn toàn thân thiện với môi trường và không gây hại cho sinh vật. So với các sản phẩm gốc vi khuẩn khác, xạ khuẩn có tính linh hoạt cao và các đặc tính tế bào đặc biệt. Tuy nhiên hiệu quả của lại phụ thuộc vào các yếu tố sinh học và phi sinh học do kiểm soát trong môi trường đất có tính biến động cao. Bên cạnh đó, một phần lớn xạ khuẩn từ môi trường không thể nuôi cấy được, bao gồm các loài vẫn chưa được biết đến và vẫn chưa có cách thức nuôi cấy đáng tin cậy và hiệu quả. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng các sản phẩm hữu cơ và vô cơ từ quá trình trao đổi chất của xạ khuẩn ảnh hưởng tiêu cực đến tính chất hang động và các trầm tích thứ cấp, chẳng hạn như nhũ đá và măng đá [70]. Tuy nhiên, những hạn chế này có thể được khắc phục, vì các nghiên cứu về vi khuẩn xạ khuẩn còn đang phát triển trong những năm gần đây, với tốc độ tương đương với các công nghệ mới. Do đó, nếu những nhược điểm này được khắc phục và thêm vào tiềm năng to lớn của vi khuẩn xạ khuẩn, những tính chất quan trọng này sẽ làm tăng thêm động lực để đào sâu nghiên cứu xạ khuẩn tạo ra cơ hội đầu tư nguồn lực vào lĩnh vực đầy hứa hẹn và đa dạng này.

### **3.3. Khả năng phân huỷ phenanthrene của các chủng xạ khuẩn được cố định trên than sinh học trong môi trường dịch thể**

Trước khi tiến hành phân tích, xác định khả năng phân hủy phenanthrene của ba chủng xạ khuẩn, thực hiện phương pháp cố định xạ khuẩn trên TSH. TSH cố định xạ khuẩn được đem đi nuôi cấy trên hai môi trường khác nhau là

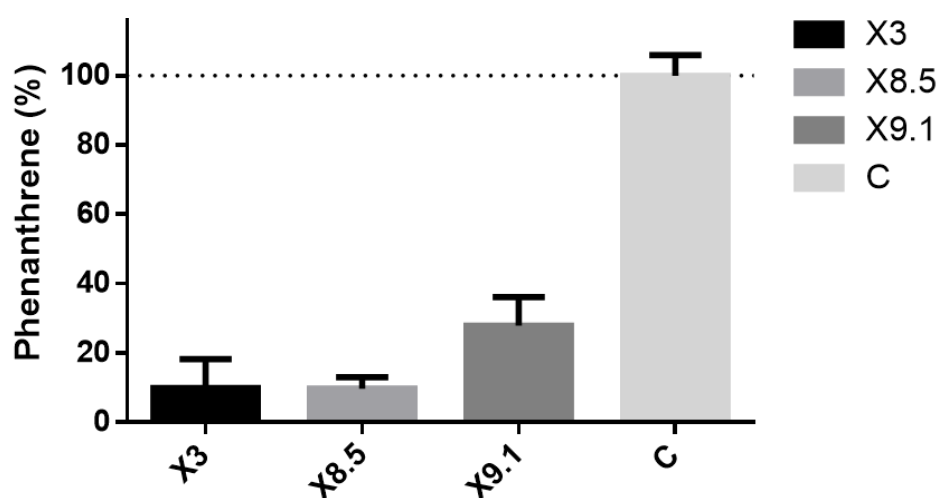
môi trường dịch Gause và môi trường đất. Đối với môi trường dịch thể, nhận thấy bào tử màu trắng mọc lên sau khi nuôi cấy, đảm bảo điều kiện không nhiễm bẩn để đem đi phân tích, kết quả thể hiện trong phụ lục hình III.2.

Tương tự như với thí nghiệm phân tích xạ khuẩn trong môi trường dịch thể, tiến hành đo và xác định nồng độ phenanthrene còn lại trong mẫu dung dịch. Kết quả thu được thể hiện trong bảng.

**Bảng 3.5:** Nồng độ phenanthrene còn lại và phần trăm phân hủy trong môi trường dịch chứa xạ khuẩn gắn trên TSH ( $\mu\text{g/mL}$ )

Chủng	Nồng độ dư lượng trung bình còn lại ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm phân hủy (%)
X3	36,3 $\pm$ 30,25	90,08
X8.5	35,67 $\pm$ 11,95	90,25
X9.1	102,44 $\pm$ 29,84	72
ĐC	365,89 $\pm$ 21,89	0

Dựa vào số liệu bảng 3.5, dựng biểu đồ thể hiện phần trăm nồng độ phenanthrene còn lại trong mẫu phân tích.



**Hình 3.3:** Biểu đồ thể hiện phần trăm phân hủy của 3 chủng xạ khuẩn cố định trên than sinh học được nuôi cấy trong môi trường dịch thể

Đầu tiên, khẳng định được sự khác biệt rõ ràng về khả năng phân hủy phenanthrene giữa ba nhóm môi trường. Đối với môi trường chỉ chứa dịch Gause, xạ khuẩn vẫn phát huy được khả năng phân hủy phenanthrene, tuy nhiên nồng độ phân hủy khá thấp, khả năng phân hủy so với nồng độ trung bình đối chứng chỉ đạt cao nhất là 35,19% ở X3.

Trong đó đối với môi trường dịch thể chứa xạ khuẩn được gắn trên TSH, ba chủng xạ khuẩn lại cho thấy hiệu quả phân hủy phenanthrene vượt trội hơn hẳn so với khi không được cố định trên TSH. Đầu tiên có thể lý giải rằng,

TSH đã làm rất tốt nhiệm vụ cố định xạ khuẩn trên bề mặt của nó, cấu trúc xốp và bề mặt chứa nhiều lỗ rỗng của TSH đã giúp xạ khuẩn được cố định chặt, làm giảm sự ức chế của nồng độ chất ô nhiễm quá mức đối với sự phát triển của xạ khuẩn, từ đó số lượng xạ khuẩn được giữ lại đáng kể, gia tăng hiệu quả phân hủy phenanthrene của chúng. Điều thứ hai có thể khẳng định TSH có thể hoạt động như một chất trung gian chuyển điện tử giữa các xạ khuẩn và chất gây ô nhiễm để tăng cường quá trình phân hủy của xạ khuẩn như các nghiên cứu đã được chứng minh [71]. Nhìn vào biểu đồ hình 3.11, nồng độ phenanthrene được phân hủy lên đến 90,25% ở X8.5 và 90,08% ở X3. Mặc dù đã có sự thay đổi tích cực, tuy nhiên khả năng phân hủy ở X9.1 chỉ đạt 71%, thấp hơn so với hai chủng còn lại.

Mặc dù vậy, qua kết quả đã được thể hiện ở trên và một vài nghiên cứu cho thấy không phải tất cả các vi khuẩn nuôi cấy đều có thể được cố định thành công trên than sinh học, chủ yếu liên quan đến đặc tính của TSH đối với các vi khuẩn được cố định trên nó [72]. Các cộng đồng vi khuẩn có thể tồn tại ở bên trong và bề mặt của TSH khác nhau tùy thuộc vào các đặc tính và loại than sinh học, loài vi khuẩn và điều kiện môi trường [73]. Nghiên cứu chỉ ra rằng *Actinobacteria* và *Proteobacteria* có hiệu quả phân hủy chất ô nhiễm hữu cơ khi TSH được nhiệt phân ở 300 °C, trong khi đó *Chloroflexi* và *Acidobacteria* lại phân hủy chất hữu cơ khi TSH được nhiệt phân ở 700 °C. Do đó, các đặc tính cụ thể của TSH dẫn đến kết quả khác nhau về khả năng phân hủy chất ô nhiễm của các loài vi khuẩn phụ thuộc vào loài vi sinh vật được cố định trên bề mặt TSH [74].

Ứng dụng cố định vi khuẩn trên TSH trong xử lý môi trường đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu khác nhau với các chất ô nhiễm và môi trường ô nhiễm khác nhau như nước thải sinh hoạt, nước thải nông nghiệp, nước thải công nghiệp,... Zang và cộng sự (2021) đã thực hiện nghiên cứu cố định *Pseudomonas mendocina* GL6 bằng TSH có nguồn gốc từ tre (được nhiệt phân ở 700 °C) để loại bỏ nitrat (100 mg/L) trong nước. Các tế bào vi khuẩn được cố định cho thấy khả năng loại bỏ gần như 100% nồng độ nitrat trong vòng 12 giờ, trong khi đó vi khuẩn không được cố định trên TSH chỉ loại đạt tỷ lệ loại bỏ là 20,63% sau 24 giờ [75]. Axit naphthenic (NA) và kim loại được loại bỏ khỏi nước công nghiệp sử dụng cơ chế cố định vi khuẩn trên TSH cũng đem lại hiệu quả vượt trội. Người ta tìm thấy rằng tỷ lệ loại bỏ NA (200 mg/L) lên tới 87%, trong khi tỷ lệ loại bỏ NA ở nhóm đối chứng vô trùng chỉ là 30% [75].

Mặc dù TSH đem lại nhiều hiệu quả cao trong việc xử lý hợp chất ô nhiễm môi trường, tuy nhiên chúng phải được kết hợp với vi sinh vật mới có thể đem lại hiệu quả tối ưu. Chu và cộng sự năm 2021, đã nghiên cứu khả năng cố định vi khuẩn để sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học *Vibrio* sp. LQ2 với TSH có nguồn gốc từ rơm ngô để xử lý diesel ô nhiễm (1%) trong đại dương. *Vibrio* sp. LQ2 có khả năng chịu mặn cao và ổn định ở môi trường axit/kiềm mạnh và chịu nhiệt từ 0-120 °C. Lượng diesel còn lại sau khi hấp



phụ giảm từ 169,2 mg xuống 8,91 mg. Tỷ lệ loại bỏ lên đến 94,7% trong khi đó TSH chỉ đạt 35,2% và tế bào vi khuẩn tự do đạt 54,4% [75].

Từ kết quả nêu trên, nhận thấy sự khác biệt rõ ràng trong khả năng phân hủy giữa xạ khuẩn và xạ khuẩn được cố định trên TSH. Khử định một lần nữa việc cố định vi khuẩn trên TSH đem lại hiệu quả trong việc hỗ trợ sự phân hủy chất ô nhiễm của xạ khuẩn nói riêng cũng như vi sinh vật nói chung. Tuy nhiên sự khác nhau về khả năng phân hủy phenanthrene của ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 có thể được giải thích rằng khả năng phân hủy phenanthrene ở mỗi chủng sẽ phụ thuộc vào các nhiệt độ khác nhau, vì vậy TSH cố định ba chủng xạ khuẩn có chung điều kiện nhiệt phân nên sẽ gây ra sự khác nhau về khả năng phân hủy phenanthrene.

Theo các nghiên cứu nêu trên, mặc dù một số loài vi khuẩn có khả năng chịu nhiệt cao cũng như độc tính từ hợp chất ô nhiễm, nhưng trong quá trình phân hủy chúng vẫn chịu sự tác động của môi trường, từ đó làm giảm khả năng phân hủy. Trong khi đó, khi được cố định trên than sinh học, cấu trúc xốp của TSH có khả năng thẩm thấu tốt, tạo nhiều vị trí bám dính, có lợi cho sự phát triển, trao đổi chất và làm giàu vi sinh vật. Qua thảo luận trên, cũng có thể khẳng định phương pháp cố định vi khuẩn trên TSH đem lại lợi ích to lớn trong việc ứng dụng xử lý các chất ô nhiễm môi trường.

### **3.5. Khả năng phân huỷ phenanthrene của các chủng xạ khuẩn được cố định trên than sinh học trong môi trường đất ô nhiễm**

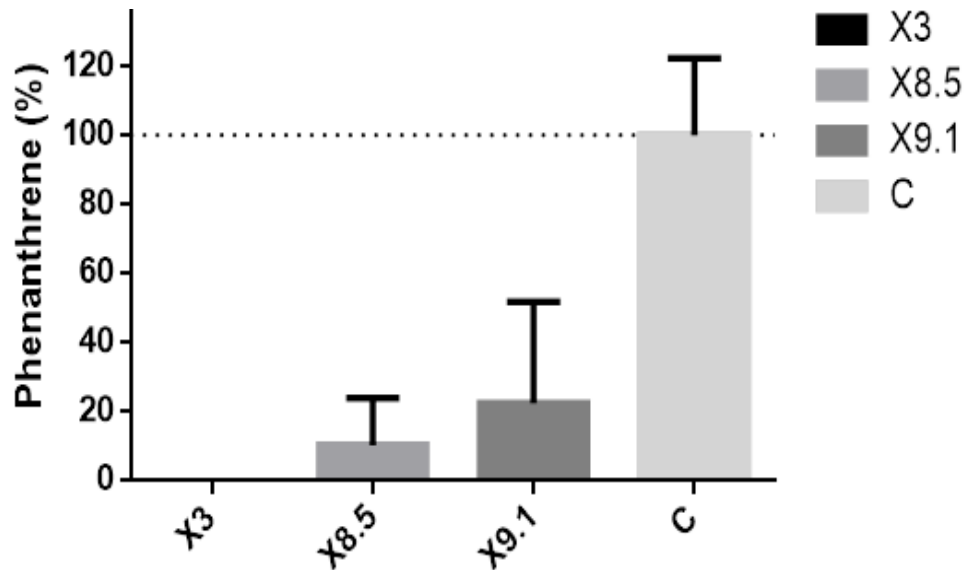
Trong thí nghiệm này, 3g TSH cố định xạ khuẩn được trộn lẫn với 60g mẫu đất có pH = 5.5, độ ẩm là 22,7% và 3g chế phẩm dinh dưỡng DHS1. Mẫu đất thực hiện thí nghiệm đã được bổ sung 200 µL phenanthrene với nồng độ phản ứng đạt 500 ppm. Mẫu phân tích đảm bảo không bị nhiễm được tiến hành thực hiện các bước tiếp theo. Kết quả nuôi cấy thể hiện trong phụ lục hình II.3.

Sau khi trộn TSH cố định xạ khuẩn vào đất, độ ẩm, độ pH và tính chất của đất vẫn được giữ nguyên. Thực hiện phương pháp tách chiết tiến hành phân tích UPLC nhằm xác định nồng độ phenanthrene còn lại trong mẫu phân tích, số liệu được tổng hợp trong bảng 3.6.

**Bảng 3.6:** Nồng độ phenanthrene còn lại và phần trăm phân hủy trong môi trường đất chứa xạ khuẩn gắn trên TSH (µg/mL)

<b>Chủng</b>	<b>Nồng độ dư lượng trung bình còn lại (µg/mL)</b>	<b>Phần trăm phân hủy (%)</b>
<b>X3</b>	0	100
<b>X8.5</b>	16,86±22,48	89,76
<b>X9.1</b>	36,88±48,23	77,6
<b>ĐC</b>	164,66±36,8	0

Từ bảng số liệu trên, có thể dễ dàng nhận ra hiệu quả vượt trội trong khả năng của ba chủng xạ khuẩn được gắn trên TSH khi được nuôi trong môi trường đất. Dựa vào bảng 3.6, dựng biểu đồ thể hiện nồng độ phenanthrene còn lại trong mẫu. Kết quả thể hiện trong hình 3.13.



**Hình 3.4:** : Biểu đồ thể hiện phần trăm phân hủy của 3 chủng xạ khuẩn cố định trên than sinh học được nuôi cấy trong môi trường dịch đất

Đầu tiên, khi nhìn vào biểu đồ hình 3.13, so sánh giữa hai môi trường đất và môi trường dịch, môi trường đất cho hiệu quả phân hủy rõ ràng, có thể nhận thấy ở chủng X3 với khả năng phân hủy lên đến 100%. Hai chủng X8.5 và X9.1 lần lượt phân hủy 89,76% và 77,6% so với nồng độ phenanthrene của trung bình đối chứng. Có thể nhận thấy, thành phần tính chất hay yếu tố độc tính của phenanthrene trong môi trường đất cũng đã gây ảnh hưởng khả năng phân hủy của xạ khuẩn. Tuy nhiên, khi được nuôi cấy trong môi trường đất, khả năng phân hủy của xạ khuẩn cố định trên TSH lại cao hơn so với trong môi trường dịch thể.

TSH có khả năng cải thiện môi trường đất từ 80-220%, do đó việc bổ sung TSH cố định xạ khuẩn đem lại hiệu quả vượt trội trong việc xử lý phenanthrene. Ngoài ra, tính chất xốp, kiềm yếu và khóa nước của TSH tạo ra môi trường sống tốt cho vi sinh vật bản địa và thúc đẩy chúng sinh trưởng, trao đổi chất. Hiệu suất hấp phụ mạnh của TSH có thể hấp phụ các chất ô nhiễm và làm giảm sự lây lan của chúng [76]. Không những vậy TSH và vi sinh vật có thể làm tăng hoạt động của enzyme trong đất như một cơ chế. Oleszczuk và cộng sự kết luận rằng các biến đổi sinh hóa trong đất bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của enzyme nên có liên quan chặt chẽ đến độ phì nhiêu của đất [77].

Mặc dù có sự khác biệt về hiệu quả phân hủy nồng độ chất ô nhiễm giữa các môi trường là khác nhau, tuy nhiên vi khuẩn cố định TSH đã chỉ ra tiềm năng ứng dụng lớn trong việc ứng dụng xử lý ô nhiễm môi trường. Ô nhiễm

môi trường. Quá trình công nghiệp hóa và đô thị hóa gia tăng đã khiến ô nhiễm môi trường trở thành vấn đề toàn cầu nghiêm trọng ảnh hưởng đến sức khỏe con người và an toàn sinh thái. Các phương pháp vật lý, hóa học, sinh học đã được tổng hợp và đề xuất nhằm mục đích phục hồi, cải tạo môi trường ô nhiễm. Tuy nhiên cần tìm ra được phương pháp đem lại hiệu quả về mặt kinh tế cũng như thân thiện với môi trường, có khả năng tái tạo và ứng dụng được trong nhiều dạng môi trường cũng như địa hình khác nhau. Ứng dụng than sinh học cố định vi khuẩn là một trong những phương pháp có tiềm năng với điều kiện nêu trên. TSH cố định vi khuẩn còn có thể được kết hợp với thực vật trong việc xử lý chất ô nhiễm hữu cơ. Là một chất hấp phụ tiết kiệm chi phí và thân thiện với môi trường, than sinh học đã được ứng dụng rộng rãi để khắc phục các chất ô nhiễm hữu cơ, chẳng hạn như malachite green, thuốc diệt cỏ có fluorinated, simazine, bisphenol A, 17  $\alpha$ -ethinyl estradiol, phenanthrene, methyl violet và diuron [78]. TSH cố định vi khuẩn cũng thể hiện sự phân hủy hiệu quả hỗn hợp *n*-ankan và hydrocacbon đa vòng thơm. *C. variabile* HRJ4 cố định bằng than sinh học làm tăng cường sự phân hủy tổng lượng hydrocacbon dầu mỏ  $\leq 78,9\%$  sau khi ủ trong 7 ngày so với *C. variabile* HRJ4 đơn lẻ [79]. Đối với xử lý ô nhiễm chất hữu cơ, đã có rất nhiều nghiên cứu chứng minh TSH cố định vi khuẩn có tiềm năng to lớn trong việc phân hủy chất ô nhiễm này. Kaili và cộng sự (2022) đã chỉ ra hiệu quả loại bỏ ô nhiễm dầu mỏ trong đất của TSH cố định vi khuẩn, kết quả cho thấy tốc độ phân hủy pyrene (PYR), benzo(*a*)pyrene (BAP) và indeno (1,2,3-*cd*) pyrene (INP) đạt lần lượt là 89,8%, 66,9% và 78,2% [80]. *Bacillus* sp. KSB7 (PBM) cố định bằng than sinh học được sử dụng để tăng cường quá trình xử lý thực vật đối với kim loại nặng và PAH trong đất bị ô nhiễm đồng thời và kết quả cho thấy rằng xử lý PBM4 đạt tỷ lệ phân hủy PAH cao nhất (36,4%) sau 90 ngày ủ. Zhang và cộng sự (2023) đã nghiên cứu sử dụng TSH cố định *Sphingobium abikonense* để xử lý đất đồng nhiễm phenanthren - Cu, nghiên cứu cho thấy tốc độ phân hủy PHE cao nhất, đạt khoảng 98%, được phát hiện trong thời gian ủ tương đối ngắn (6 ngày) khi xử lý bằng viên TSH cố định vi khuẩn [58].

Các công nghệ vật lý và hóa học truyền thống như bãi chôn lấp, tái chế, loại bỏ và xử lý ngoài hiện trường, đốt, rửa đất, lò phản ứng pha rắn, oxy hóa hóa học, thủy phân, phân hủy nhiệt và quang phân đều được xử lý tại chỗ và ngoài hiện trường. Quá trình xử lý, phân hủy chất thải tạo ra một lượng đáng kể các chất ô nhiễm nguy hiểm như cacbon monoxide và metan. Vì vậy, việc khắc phục bằng các phương pháp xử lý chất ô nhiễm độc hại bằng các phương pháp này không phải là một phương pháp tối ưu. Việc thải các khí này vào khí quyển gây ra biến đổi khí hậu nghiêm trọng. Đồng thời, việc đổ các vật liệu đã qua sử dụng như túi polyetylen, cao su và các vật dụng khác vào bãi chôn lấp gây ra mối đe dọa đáng kể đối với vi sinh vật đất và gây hại cho môi trường. Các kỹ thuật xử lý thông thường như đốt, đổ rác và tái chế polythene đều nguy hiểm cho sức khỏe con người và tốn kém, mất thời gian và tổn

nhiều công sức. Chính vì vậy, TSH cố định vi khuẩn được cho là một giải pháp gần như tối ưu về chi phí, công sức cũng như là nguồn nguyên liệu có thể tái tạo, thân thiện với môi trường. Tại Việt Nam, việc sử dụng TSH là một nguồn nguyên liệu trong xử lý môi trường là rất hợp lý do nguồn nguyên liệu dồi dào và chi phí rẻ.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Ba chủng xạ khuẩn được cố định trên TSH, hình ảnh chụp SEM cho thấy khả năng bám dính của bào tử xạ khuẩn trên bề mặt TSH, số lượng xạ khuẩn trong hỗn hợp cố định đạt lần lượt với ba chủng X3, X8.5, X9.1 là  $1,7.10^8 \pm 0,07$ ;  $1,7.10^8 \pm 0,49$ ;  $1,4.10^8 \pm 0,0$ .

2. Khả năng phân hủy hợp chất ô nhiễm đa vòng thơm phenanthrene bởi ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 trong môi trường dịch thể sau 14 ngày lần lượt là 35,19%; 17,95% và 12,68%. X3 là chủng có phần trăm phân hủy phenanthrene cao nhất trong môi trường dịch thể.

3. Xạ khuẩn cố định trên TSH có khả năng phân hủy phenanthrene trong cả hai dạng môi trường là môi trường dịch thể và đất ô nhiễm. Trong môi trường dịch thể ba chủng X3, X8.5, X9.1 lần lượt có hiệu suất phân hủy là 90,08%; 90,25% và 72%. Trong môi trường đất ô nhiễm phenanthrene sau 14 ngày, chủng X3 cố định trên TSH phân hủy hoàn toàn phenanthrene (100%), trong khi hai chủng X8.5 và X9.1 hiệu suất lần lượt đạt 89,76% và 77,6%.

### KIẾN NGHỊ

1. Thử nghiệm và đưa vào sản xuất thành dạng chế phẩm hỗ trợ xử lý ô nhiễm chất ô nhiễm vòng thơm với chủng X3.

2. Đánh giá hiệu quả của xạ khuẩn cố định trên TSH trong điều kiện môi trường ô nhiễm khác nhau tại Việt Nam.

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] “On Molecular Descriptors of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon,” *Polycyclic Aromatic Compounds*, Aug. 2023.
- [2] “pahs\_factsheet\_cdc\_2013.pdf.” Accessed: Mar. 07, 2024. [Online]. Available: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-03/documents/pahs\\_factsheet\\_cdc\\_2013.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-03/documents/pahs_factsheet_cdc_2013.pdf)
- [3] G. P. Moss, “Nomenclature of fused and bridged fused ring systems (IUPAC Recommendations 1998),” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 70, no. 1, pp. 143–216, Jan. 1998, doi: 10.1351/pac199870010143.
- [4] “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): What Health Effects Are Associated With PAH Exposure? | Environmental Medicine | ATSDR.” Accessed: Mar. 07, 2024. [Online]. Available: [https://www.atsdr.cdc.gov/csem/polycyclic-aromatic-hydrocarbons/health\\_effects.html](https://www.atsdr.cdc.gov/csem/polycyclic-aromatic-hydrocarbons/health_effects.html)
- [5] A. B. Patel, S. Shaikh, K. R. Jain, C. Desai, and D. Madamwar, “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches,” *Front. Microbiol.*, vol. 11, Nov. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.562813.
- [6] T. L. Smith *et al.*, “Species-specific testicular and hepatic microsomal metabolism of benzo(a)pyrene, an ubiquitous toxicant and endocrine disruptor,” *Toxicology in Vitro*, vol. 21, no. 4, pp. 753–758, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.tiv.2007.01.005.
- [7] K. Srogi, “Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review,” *Environ Chem Lett*, vol. 5, no. 4, pp. 169–195, Nov. 2007, doi: 10.1007/s10311-007-0095-0.
- [8] K. Ravindra, R. Sokhi, and R. Van Grieken, “Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation,” *Atmospheric Environment*, vol. 42, no. 13, pp. 2895–2921, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.atmosenv.2007.12.010.
- [9] H. I. Abdel-Shafy and M. S. M. Mansour, “A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediationĐánh giá về hydrocarbon thơm đa vòng: Nguồn, tác động môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và khắc phục,” *Egyptian Journal of Petroleum*, vol. 25, no. 1, pp. 107–123, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.011.
- [10] G. Safo-Adu, F. Attiogbe, I. Emahi, and F. G. Ofori, “A review of the sources, distribution sequences, and health risks associated with exposure to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons,” *Cogent Engineering*, vol. 10, no. 1, p. 2199511, Dec. 2023, doi: 10.1080/23311916.2023.2199511.
- [11] H. I. Abdel-Shafy and M. S. M. Mansour, “A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on

human health and remediation,” *Egyptian Journal of Petroleum*, vol. 25, no. 1, pp. 107–123, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.011.

[12] “History of biochar”.

[13] M. Farrell *et al.*, “Microbial utilisation of biochar-derived carbon,” *Science of The Total Environment*, vol. 465, pp. 288–297, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.090.

[14] L. Leng, *Biochar for carbon sequestration: stability of biochar carbon*. 2023. doi: 10.13140/RG.2.2.36204.95368.

[15] F. Amalina, A. S. A. Razak, S. Krishnan, H. Sulaiman, A. W. Zularisam, and M. Nasrullah, “Biochar production techniques utilizing biomass waste-derived materials and environmental applications – A review,” *Journal of Hazardous Materials Advances*, vol. 7, p. 100134, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.hazadv.2022.100134.

[16] Trịnh M. V., Cường T. V., Quỳnh V. D., and Thu N. T. H., “NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT THAN SINH HỌC TỪ RỖM RẠ VÀ TRÁU ĐÈ PHỤC VỤ NÂNG CAO ĐỘ PHÌ ĐẤT, NĂNG SUẤT CÂY TRỒNG VÀ GIẢM PHÁT THẢI KHÍ NHÀ KÍNH”.

[17] D. Meyer-Kohlstock, “Biochar - A Survey,” 2009.

[18] S. Sohi, E. Lopez-Capel, E. Krull, and R. Bol, “Biochar, Climate Change and Soil: A Review to Guide Future Research,” *CSIRO Land and Water Science Report*, vol. 5, Mar. 2009.

[19] P. Winsley, “Biochar and bioenergy production for climate change mitigation,” *New Zealand Science Review Vol*, vol. 64, Jan. 2007.

[20] A. Demirbaş, “Combustion Characteristics of Different Biomass Fuels,” *Progress in Energy and Combustion Science*, vol. 30, pp. 219–230, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.pecs.2003.10.004.

[21] J. Lehmann and S. Joseph, “Biochar for environmental management: An introduction. Biochar for environmental management. Science and technology,” *Earthscan Publishers Ltd*, Jan. 2009.

[22] “Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation,” Routledge & CRC Press. Accessed: Mar. 11, 2024. [Online]. Available: <https://www.routledge.com/Biochar-for-Environmental-Management-Science-Technology-and-Implementation/Lehmann-Joseph/p/book/9780367779184>

[23] B. D. Satriawan and E. Handayanto, “Effects of Biochar and Crop Residues Application on Chemical Properties of a Degraded Soil of South Malang, and P Uptake by Maize,” *JDMLM*, vol. 2, no. 2, pp. 271–280, 2015, doi: 10.15243/jdmlm.2014.022.271.

[24] Y. Zhang, O. J. Idowu, and C. E. Brewer, “Using Agricultural Residue Biochar to Improve Soil Quality of Desert Soils,” *Agriculture*, vol. 6, no. 1, Art. no. 1, Mar. 2016, doi: 10.3390/agriculture6010010.

[25] A. Nigussie, E. Kissi, M. Misganaw, and G. Ambaw, “Effect of Biochar Application on Soil Properties and Nutrient Uptake of Lettuces

(*Lactuca sativa*) Grown in Chromium Polluted Soils,” *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, vol. 12, pp. 369–376, Jan. 2012.

[26] B. A. Bakry, O. M. Ibrahim, A. R. Eid, and E. A. Badr, “Effect of Humic Acid, Mycorrhiza Inoculation, and Biochar on Yield and Water Use Efficiency of Flax under Newly Reclaimed Sandy Soil,” *Agricultural Sciences*, vol. 5, no. 14, Art. no. 14, Dec. 2014, doi: 10.4236/as.2014.514153.

[27] “Johannes et al. - 2002 - Slash-and-char a feasible alternative for soil fe.pdf.” Accessed: Mar. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.css.cornell.edu/faculty/lehmann/publ/Lehmann%20et%20al.,%2002002,%20WCSS%20Bangkok,%20paper%20no.0449.pdf>

[28] “Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Kim Nữ Thảo (2006), Các nhóm vi khuẩn chủ yếu-Phân loại - Tài liệu text.” Accessed: Mar. 27, 2024. [Online]. Available: <https://toc.123docz.net/document/593249-nguyen-lan-dung-nguyen-kim-nu-thao-2006-cac-nhom-vi-khuan-chu-yeu-phan-loai-xa-khuan.htm>

[29] “Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro - PubMed.” Accessed: Mar. 27, 2024. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17331842/>

[30] “[PDF]GIÁO TRÌNH: VI SINH VẬT HỌC (GS Nguyễn Lâm Dũng).pdf.” Accessed: Mar. 27, 2024. [Online]. Available: <https://tailieumienphi.vn/doc/giao-trinh-vi-sinh-vat-hoc-gs-nguyen-lan-dung-u8vtvtq.html>

[31] “Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. - PMC.” Accessed: Mar. 27, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184585/>

[32] “Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology | SpringerLink.” Accessed: Mar. 28, 2024. [Online]. Available: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-16-5835-8>

[33] L. Arregui *et al.*, “Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation,” *Microb Cell Fact*, vol. 18, no. 1, p. 200, Nov. 2019, doi: 10.1186/s12934-019-1248-0.

[34] “Microbial utilisation of biochar-derived carbon - PubMed.” Accessed: Mar. 28, 2024. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23623696/>

[35] W.-Y. Huang *et al.*, “Aerobic co-composting degradation of highly PCDD/F-contaminated field soil. A study of bacterial community,” *Sci Total Environ*, vol. 660, pp. 595–602, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.312.

[36] M. Kästner, M. Breuer-Jammali, and B. Mahro, “Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH),” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 41, no. 2, pp. 267–273, Apr. 1994, doi: 10.1007/BF00186971.



[37] A. R. Johnsen, A. Winding, U. Karlson, and P. Roslev, "Linking of Microorganisms to Phenanthrene Metabolism in Soil by Analysis of <sup>13</sup>C-Labeled Cell Lipids," *Appl Environ Microbiol*, vol. 68, no. 12, pp. 6106–6113, Dec. 2002, doi: 10.1128/AEM.68.12.6106-6113.2002.

[38] N. Leneva, M. Kolomytseva, B. Baskunov, and L. Golovleva, "Phenanthrene and anthracene degradation by microorganisms of the genus *Rhodococcus*," *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 45, pp. 169–175, Jan. 2009, doi: 10.1134/S0003683809020094.

[39] M. Kumar, C. V. Lakshmi, and S. Khanna, "Biodegradation and bioremediation of endosulfan contaminated soil," *Bioresour Technol*, vol. 99, no. 8, pp. 3116–3122, May 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.057.

[40] S. Chen, K. Lai, Y. Li, M. Hu, Y. Zhang, and Y. Zeng, "Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 90, no. 4, pp. 1471–1483, May 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3136-3.

[41] C.-I. Mawang, A.-S. Azman, A.-S. M. Fuad, and M. Ahamad, "Actinobacteria: An eco-friendly and promising technology for the bioaugmentation of contaminants," *Biotechnol Rep (Amst)*, vol. 32, p. e00679, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.btre.2021.e00679.

[42] H. Habe, Y. Ashikawa, Y. Saiki, T. Yoshida, H. Nojiri, and T. Omori, "Sphingomonas sp. strain KA1, carrying a carbazole dioxygenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-p-dioxins in soil," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 211, no. 1, pp. 43–49, May 2002, doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11201.x.

[43] S. Saibu, S. A. Adebusoye, and G. O. Oyetibo, "Aerobic bacterial transformation and biodegradation of dioxins: a review," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 7, no. 1, p. 7, Feb. 2020, doi: 10.1186/s40643-020-0294-0.

[44] C. Wu, D. Zhi, B. Yao, Y. Zhou, Y. Yang, and Y. Zhou, "Immobilization of microbes on biochar for water and soil remediation: A review," *Environmental Research*, vol. 212, p. 113226, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.113226.

[45] G. Mannina, H. Gulhan, and B.-J. Ni, "Water reuse from wastewater treatment: The transition towards circular economy in the water sector," *Bioresource Technology*, vol. 363, p. 127951, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2022.127951.

[46] S. Zhang and J. Wang, "Removal of chlortetracycline from water by *Bacillus cereus* immobilized on Chinese medicine residues biochar," *Environmental Technology & Innovation*, vol. 24, p. 101930, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.eti.2021.101930.

[47] X. Qi *et al.*, "Biochar-based microbial agent reduces U and Cd accumulation in vegetables and improves rhizosphere microecology," *Journal*

of *Hazardous Materials*, vol. 436, p. 129147, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129147.

[48] L. Zhao *et al.*, “Biochar as simultaneous shelter, adsorbent, pH buffer, and substrate of *Pseudomonas citronellolis* to promote biodegradation of high concentrations of phenol in wastewater,” *Water Research*, vol. 172, p. 115494, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.watres.2020.115494.

[49] A. Youngwilai *et al.*, “Simultaneous manganese adsorption and biotransformation by *Streptomyces violarius* strain SBP1 cell-immobilized biochar,” *Science of The Total Environment*, vol. 713, p. 136708, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136708.

[50] B. Xiong, Y. Zhang, Y. Hou, H. P. H. Arp, B. J. Reid, and C. Cai, “Enhanced biodegradation of PAHs in historically contaminated soil by *M. gilvum* inoculated biochar,” *Chemosphere*, vol. 182, pp. 316–324, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.020.

[51] A. Q. Wahla *et al.*, “Immobilization of metribuzin-degrading bacteria on biochar: Enhanced soil remediation and bacterial community restoration,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, 2023, Accessed: Dec. 28, 2023. [Online]. Available:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1027284>

[52] M. Abu Talha, M. Goswami, B. S. Giri, A. Sharma, B. N. Rai, and R. S. Singh, “Bioremediation of Congo red dye in immobilized batch and continuous packed bed bioreactor by *Brevibacillus parabrevis* using coconut shell bio-char,” *Bioresource Technology*, vol. 252, pp. 37–43, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.081.

[53] Y. Chen *et al.*, “Remediation of Chromium-Contaminated Soil Based on *Bacillus cereus* WHX-1 Immobilized on Biochar: Cr(VI) Transformation and Functional Microbial Enrichment,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, Mar. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.641913.

[54] Q. Wang *et al.*, “Biochar immobilized petroleum degrading consortium for enhanced granulation and treatment of synthetic oil refinery wastewater,” *Bioresource Technology Reports*, vol. 17, p. 100909, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.biteb.2021.100909.

[55] L. Lu, A. Li, X. Ji, S. He, and C. Yang, “Surfactant-facilitated alginate-biochar beads embedded with PAH-degrading bacteria and their application in wastewater treatment,” *Environ Sci Pollut Res*, vol. 28, no. 4, pp. 4807–4814, Jan. 2021, doi: 10.1007/s11356-020-10830-z.

[56] L. Lu, A. Li, X. Ji, C. Yang, and S. He, “Removal of acenaphthene from water by Triton X-100-facilitated biochar-immobilized *Pseudomonas aeruginosa*,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 41, pp. 23426–23432, Jun. 2018, doi: 10.1039/C8RA03529F.

[57] T. Sun, J. Miao, M. Saleem, H. Zhang, Y. Yang, and Q. Zhang, “Bacterial compatibility and immobilization with biochar improved tebuconazole degradation, soil microbiome composition and functioning,”

*Journal of Hazardous Materials*, vol. 398, p. 122941, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122941.

[58] Y. Zhang *et al.*, “Sustained and efficient remediation of biochar immobilized with *Sphingobium abikonense* on phenanthrene-copper co-contaminated soil and microbial preferences of the bacteria colonized in biochar,” *Biochar*, vol. 5, no. 1, p. 43, Jul. 2023, doi: 10.1007/s42773-023-00241-x.

[59] E. Lopez-Echartea, T. Macek, K. Demnerova, and O. Uhlik, “Bacterial Biotransformation of Pentachlorophenol and Micropollutants Formed during Its Production Process,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 13, no. 11, p. 1146, Nov. 2016, doi: 10.3390/ijerph13111146.

[60] “Hamid: An explanation of soil amendments to reduce... - Google Scholar.” Accessed: Dec. 28, 2023. [Online]. Available: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=An+explanation+of+soil+amendments+to+reduce+cadmium+phyto-availability+and+transfer+to+food+chain&author=Hamid,+Y.&author=Tang,+L.&author=Sohail,+C.M.I.X.&author=Hussain,+B.&author=Aziz,+M.Z.M.&author=Usman,+M.&author=He,+Z.L.&author=Yang,+X.&publication\\_year=2019&journal=Sci.+Total+Environ.&volume=660&pages=80%E2%80%9396&doi=10.1016/j.scitotenv.2018.12.419](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=An+explanation+of+soil+amendments+to+reduce+cadmium+phyto-availability+and+transfer+to+food+chain&author=Hamid,+Y.&author=Tang,+L.&author=Sohail,+C.M.I.X.&author=Hussain,+B.&author=Aziz,+M.Z.M.&author=Usman,+M.&author=He,+Z.L.&author=Yang,+X.&publication_year=2019&journal=Sci.+Total+Environ.&volume=660&pages=80%E2%80%9396&doi=10.1016/j.scitotenv.2018.12.419)

[61] “Enhancing Bioremediation with Enzymatic Processes: A Review | Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management | Vol 10, No 2.” Accessed: Nov. 29, 2023. [Online]. Available: [https://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/\(ASCE\)1090-025X\(2006\)10:2\(73\)](https://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/(ASCE)1090-025X(2006)10:2(73))

[62] Nghĩa N. K., “Hiệu quả phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu propoxur trong đất của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong bã cà phê,” *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, no. 52, Art. no. 52, Oct. 2017, doi: 10.22144/ctu.jvn.2017.121.

[63] “Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu.” Accessed: Aug. 23, 2024. [Online]. Available: <https://nsti.vista.gov.vn/publication/view/buoc-dau-nghien-cuu-tao-che-pham-xu-ly-o-nhiem-dau-bang-vi-khuan-tao-mang-sinh-hoc-tren-than-sinh-hoc-co-nguon-goc-tu-trau-358816.html>

[64] G. M. Titato and F. M. Lanças, “Optimization and validation of HPLC-UV-DAD and HPLC-APCI-MS methodologies for the determination of selected PAHs in water samples,” *J Chromatogr Sci*, vol. 44, no. 1, pp. 35–40, Jan. 2006, doi: 10.1093/chromsci/44.1.35.

[65] S. Gopalakrishnan *et al.*, “Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for biological control of *Fusarium* wilt of chickpea,” *Crop Protection - CROP PROT*, vol. 30, pp. 1070–1078, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.cropro.2011.03.006.

[66] L. Pizzul, M. del Pilar Castillo, and J. Stenström, “Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic

hydrocarbons in liquid culture and spiked soil,” *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 22, no. 7, pp. 745–752, Jul. 2006, doi: 10.1007/s11274-005-9100-6.

[67] S. Devanshi *et al.*, “Actinomycetes as An Environmental Scrubber,” in *Crude Oil - New Technologies and Recent Approaches*, IntechOpen, 2021. doi: 10.5772/intechopen.99187.

[68] J. Li *et al.*, “Identification of an efficient phenanthrene-degrading *Pseudarthrobacter* sp. LISW and characterization of its metabolites and catabolic pathway,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 465, p. 133138, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.133138.

[69] L. L. Daane, I. Harjono, G. J. Zylstra, and M. M. Häggblom, “Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, no. 6, pp. 2683–2691, Jun. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.6.2683-2691.2001.

[70] C. Schabereiter-Gurtner, C. Saiz-Jimenez, G. Piñar, W. Lubitz, and S. Rölleke, “Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma),” *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 47, no. 2, pp. 235–247, Feb. 2004, doi: 10.1016/S0168-6496(03)00280-0.

[71] “Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review,” *Environmental Pollution*, vol. 227, pp. 98–115, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2017.04.032.

[72] Z. Dai, A. Barberán, Y. Li, P. C. Brookes, and J. Xu, “Bacterial Community Composition Associated with Pyrogenic Organic Matter (Biochar) Varies with Pyrolysis Temperature and Colonization Environment,” *mSphere*, vol. 2, no. 2, p. 10.1128/msphere.00085-17, Mar. 2017, doi: 10.1128/msphere.00085-17.

[73] S. Bashir, A. Fischer, I. Nijenhuis, and H.-H. Richnow, “Enantioselective Carbon Stable Isotope Fractionation of Hexachlorocyclohexane during Aerobic Biodegradation by *Sphingobium* spp.,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 20, pp. 11432–11439, Oct. 2013, doi: 10.1021/es402197s.

[74] Y. Zhang *et al.*, “Sustained and efficient remediation of biochar immobilized with *Sphingobium abikonense* on phenanthrene-copper co-contaminated soil and microbial preferences of the bacteria colonized in biochar,” *Biochar*, vol. 5, no. 1, p. 43, Jul. 2023, doi: 10.1007/s42773-023-00241-x.

[75] “Techniques and mechanisms of bacteria immobilization on biochar for further environmental and agricultural applications - ScienceDirect.” Accessed: Aug. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944501323002367>

[76] E. Kabir, K.-H. Kim, and E. E. Kwon, “Biochar as a tool for the improvement of soil and environment,” *Front. Environ. Sci.*, vol. 11, Dec. 2023, doi: 10.3389/fenvs.2023.1324533.

[77] C. Wu, D. Zhi, B. Yao, Y. Zhou, Y. Yang, and Y. Zhou, “Immobilization of microbes on biochar for water and soil remediation: A review,” *Environmental Research*, vol. 212, p. 113226, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.113226.

[78] L. Xiang *et al.*, “Integrating Biochar, Bacteria, and Plants for Sustainable Remediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants,” *Environ Sci Technol*, vol. 56, no. 23, pp. 16546–16566, Dec. 2022, doi: 10.1021/acs.est.2c02976.

[79] H. Zhang, J. Tang, L. Wang, J. Liu, R. G. Gurav, and K. Sun, “A novel bioremediation strategy for petroleum hydrocarbon pollutants using salt tolerant *Corynebacterium variabile* HRJ4 and biochar,” *J Environ Sci (China)*, vol. 47, pp. 7–13, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.jes.2015.12.023.

[80] K. Qiao *et al.*, “Removal of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a microbial consortium immobilized in magnetic floating biochar gel beads,” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 159, p. 111489, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111489.

**PHỤ LỤC I:**  
**DANH MỤC KÝ HIỆU MẪU THÍ NGHIỆM**

**Bảng I.1:** Danh mục ký hiệu mẫu chạy UHPLC và môi trường nuôi cấy của ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1

STT	Ký hiệu chủng	Ký hiệu mẫu chạy UPLC	Môi trường nuôi cấy	Mẫu phân tích
<b>Môi trường dịch thể</b>				
1	X3'	M1	Gause	X3
2	X3	M2	Gause	X3
3	X9.1	M3	Gause	X8.5
4	X9.1'	M4	Gause	X8.5
5	X8.5'	M5	Gause	X9.1
6	X8.5	M6	Gause	X9.1
7	X8.5 (1)	M7	Gause + TSH	TSH X3
8	X8.5 (2)	M8	Gause + TSH	TSH X3
9	X9.1 (1)	M9	Gause + TSH	TSH X8.5
10	X9.2 (2)	M10	Gause + TSH	TSH X8.5
11	X3 (1)	M11	Gause + TSH	TSH X9.1
12	X3 (2)	M12	Gause + TSH	TSH X9.1
<b>Môi trường đất ô nhiễm</b>				
13	X3 (1)	M13	Đất + TSH + DHS1	TSH X3
14	X3 (2)	M14	Đất + TSH + DHS1	TSH X3
15	X8.5 (1)	M15	Đất + TSH + DHS1	TSH X8.5
16	X8.5 (2)	M16	Đất + TSH + DHS1	TSH X8.5
17	X9.1 (1)	M17	Đất + TSH + DHS1	TSH X9.1
18	X9.2 (2)	M18	Đất + TSH + DHS1	TSH X9.1
<b>Nhóm đối chứng</b>				
19	ĐC1'	ĐC1'	Gause	Đối chứng
20	ĐC2'	ĐC2'	Gause	Đối chứng
21	ĐC1	ĐC1	Gause + TSH	Đối chứng
22	ĐC2	ĐC2	Gause + TSH	Đối chứng
23	ĐC3	ĐC3	Đất, DHS1 và TSH không gắn chủng	Đối chứng

**PHỤ LỤC II:**  
**HÌNH ẢNH KẾT QUẢ QUÁ TRÌNH TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM**

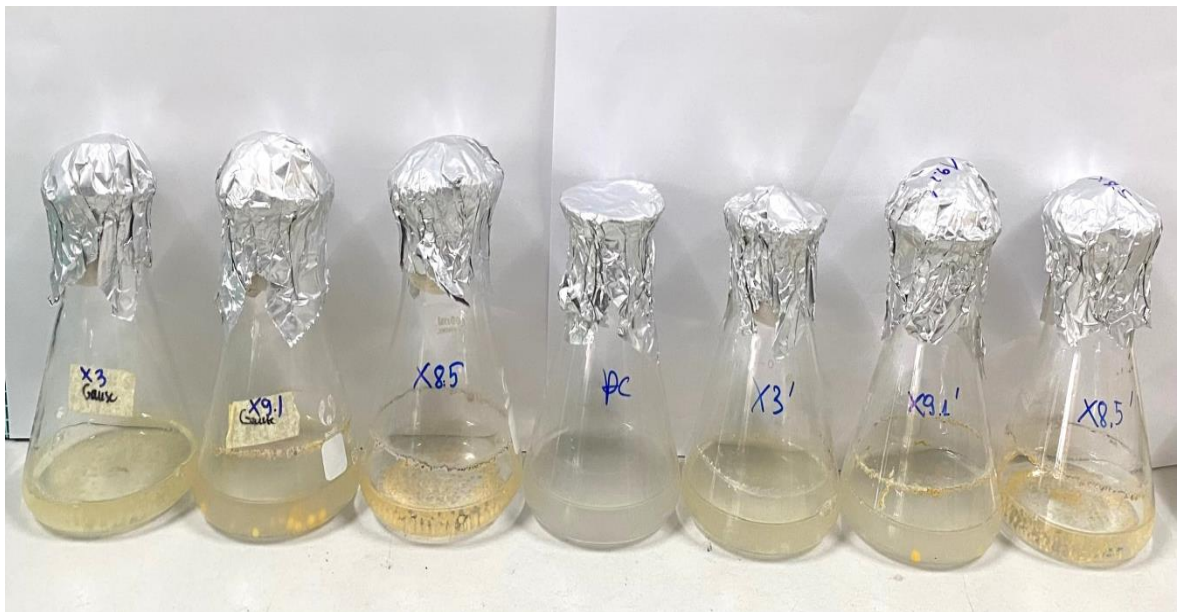


(a)

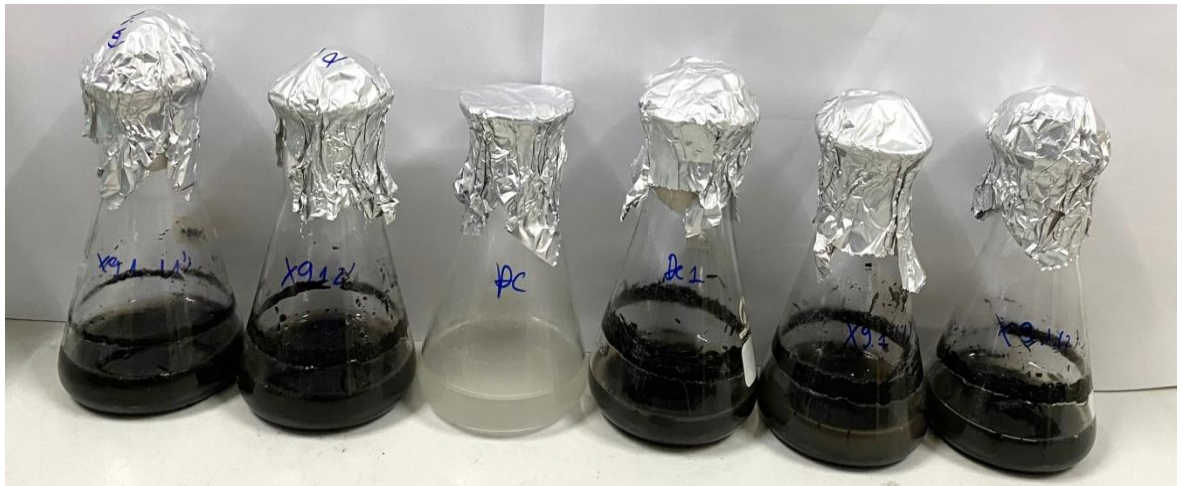
(b)

**Hình II.1:** Mẫu TSH cố định xạ khuẩn

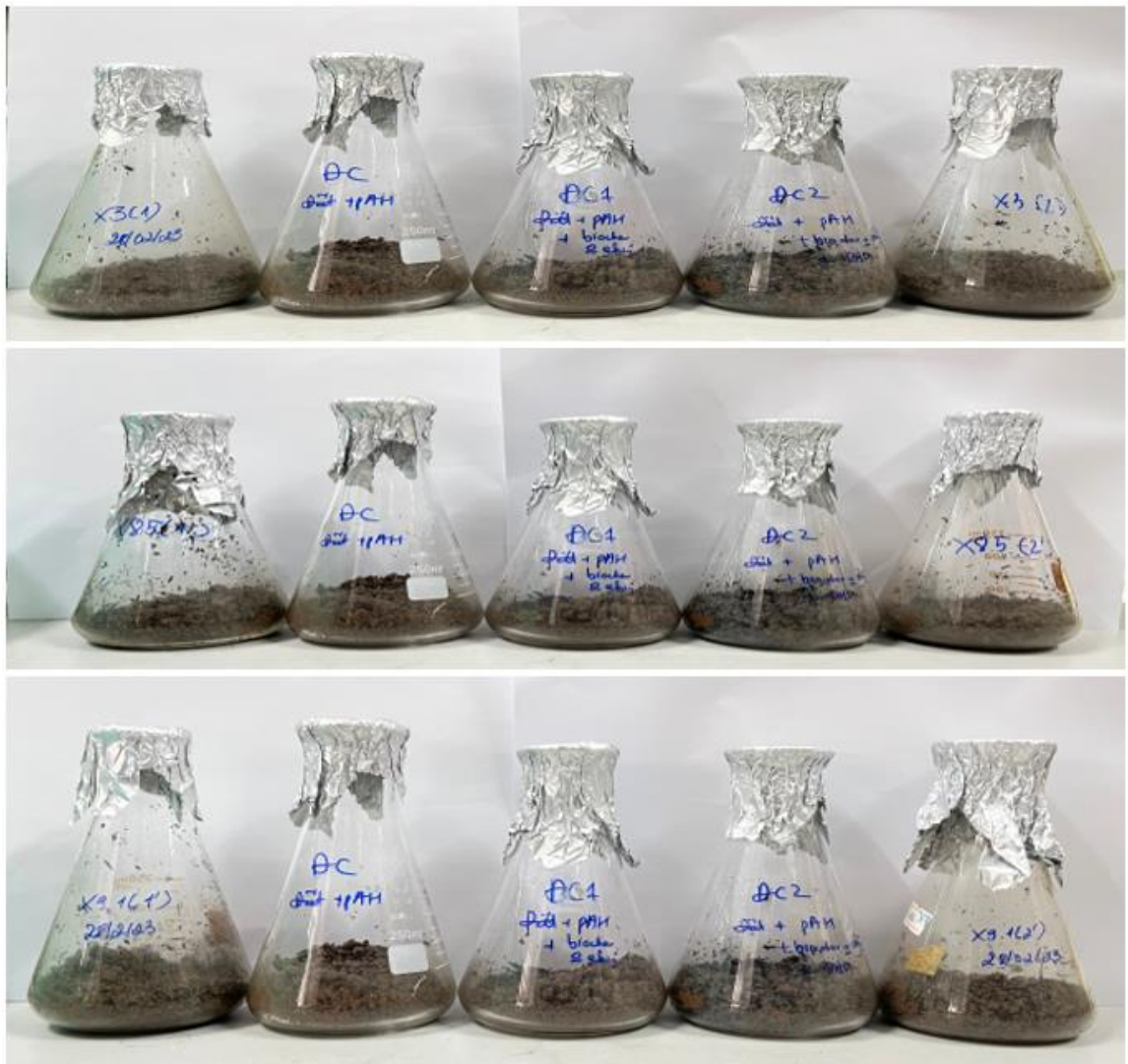
(a): *Đối chứng*, (b): *Thí nghiệm*



**Hình II.2:** Mẫu đối chứng và thí nghiệm chủng xạ khuẩn được nuôi cấy môi trường dịch thể



**Hình II.3:** Mẫu đối chứng và thí nghiệm TSH có gắn chủng xạ khuẩn được nuôi cấy môi trường dịch thể có chứa phenanthrene



**Hình II.4:** Mẫu đối chứng và thí nghiệm TSH có gắn chủng xạ khuẩn được nuôi cấy môi trường đất có chứa phenanthrene





**Hình II.5:** Hình ảnh mẫu đất được trộn lẫn TSH có gắn chủng xạ khuẩn