

PHÂN LẬP, PHÂN LOẠI VÀ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DDT, DDD VÀ DDE CỦA MỘT SỐ CHŨNG NẤM SỢI

Nguyễn Nguyên Quang, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Công nghệ phân hủy sinh học các hợp chất hữu cơ khó phân hủy là một biện pháp xử lý mang lại hiệu quả cao, có thể khoáng hóa hoàn toàn các chất ô nhiễm nguy hiểm mà không tạo ra các sản phẩm thứ cấp. Thử nghiệm xử lý hỗn hợp chất ô nhiễm DDT, DDD, DDE, HCH... đã được tiến hành trong bioreactor 100 kg. Để đánh giá vai trò vi sinh vật tham gia trong quá trình phân hủy, các nghiên cứu phân lập và xác định khả năng phân hủy hỗn hợp thuốc trừ sâu trong đó có DDT và hai dẫn xuất là DDD, DDE bởi một số chủng đã được thực hiện đối với mẫu đất 7 ngày sau xử lý. Năm chủng nấm sợi và 2 chủng vi khuẩn đã được phân lập có khả năng phân hủy sinh học DDT. Trình tự gen mã hóa 18S rRNA của FNA4 có mức tương đồng 99 - 100% với các chủng nấm sợi thuộc ngành nấm nang *Ascomycetes*, ngành phụ *Pezizomycotina* và chi *Aspergillus*. Dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và so sánh một phần trình tự gen mã hóa 18S rRNA chủng FNA4 được xếp vào chi *Aspergillus* và có tên là *Aspergillus* sp. FNA4. Trình tự đoạn gen này đã được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số EU795695. Sau 14 ngày nuôi cấy, chủng nấm FNA4 đã phân hủy được 94,5% hỗn hợp DDT, DDE và DDD so với mẫu không có vi sinh vật. Cũng sau thời gian 14 ngày, tất cả các chủng nấm đều sinh enzyme laccase. Trong năm chủng này, FNA4 chỉ sinh ra enzyme laccase với hoạt lực là 15,4 U/l. Bốn chủng FNA1, FNA2, FNA3 và FNA5 không những sinh ra laccase với hoạt lực theo thứ tự là 30,9; 33,8; 9,2; 12,3 U/l mà FNA1 và FNA2 còn sinh ra lignin peroxidase với hoạt tính thứ tự là 187,1 U/l, 34,6 U/l. Hai chủng FNA3 và FNA5 sinh manganese peroxidase với hoạt tính khá cao trong môi trường có DDT lần lượt 1076,0 U/l, 470,8 U/l.

Từ khóa: Bioreactor, DDT, enzyme ngoại bào, FNA4, 18S rRNA

MỞ ĐẦU

Theo thống kê của Bộ Tài nguyên Môi trường ngày 13/8/2007, hiện nay nước ta còn 108 tấn hóa chất bảo vệ thực vật nguy hại, chiếm 8 trong 12 hợp chất hữu cơ khó phân hủy (POPs) và 55.000m³ đất nhiễm hoặc lẫn các loại hóa chất này, trong đó có 1,1,1-trichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl) ethane (DDT) nằm rải rác ở 23 tỉnh, đặc biệt diện tích đất bị ô nhiễm nặng được tìm thấy tại các địa phương như Nghệ An (Kim Liên I và II, Nam Đàn), Thái Nguyên, Tuyên Quang... Tính độc của DDT được biết đến như là một chất có khả năng gây ung thư cho người và động vật, gây đột biến và là chất gây ô nhiễm môi trường tồn tại lâu dài trong tự nhiên (Francis *et al*, 1976). Trong các khu vực ô nhiễm DDT luôn đi kèm với sự xuất hiện của 1,1-dichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl) ethane (DDD) và 1,1-dichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl) ethylene (DDE). Cả DDD và DDE đều là sản phẩm chuyển hóa của DDT. DDD là sản phẩm trung gian của quá trình dechlorination của DDT bởi vi sinh vật hoặc kết quả của phản ứng hóa học. DDE là sản phẩm của quá trình

khử HCl của vi khuẩn sau phản ứng quang hóa DDT của ánh sáng mặt trời (Aislabie *et al.*, 1997).

Để xử lý ô nhiễm DDT, DDE, DDD, trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã có một số phương pháp khử độc khác nhau được nghiên cứu và áp dụng như phương pháp thiêu đốt ở nhiệt độ cao, chôn lấp, cô lập, hóa lý, sinh học... Phương pháp phân hủy sinh học là một trong các phương pháp được quan tâm hiện nay do tính an toàn và chi phí thấp. Trong các tập đoàn vi sinh vật tham gia phân hủy, chuyển hóa hỗn hợp DDT, DDD, DDE, HCH... thì nấm có các enzyme peroxidase và vi khuẩn phân hủy chlorophenyl đang được ứng dụng cho các quá trình phân hủy thuốc trừ sâu thuộc nhóm POPs (Aislabie *et al.*, 1997). Phương pháp kích thích sinh học thực hiện ở bioreactor hiếu khí 100 kg là một trong các phương pháp của công nghệ phân hủy sinh học đang được phòng công nghệ sinh học môi trường, Viện CNSH thực hiện để xử lý đất nhiễm hỗn hợp của DDT, DDD, DDE, Hexachlorocyclohexane (HCH), Heptachlor, Aldrin, Diendrin, Endrin ở nồng độ khá cao. Trong công trình này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập, phân loại và khả năng phân

hủy DDT, DDD, DDE của nấm sợi và vi khuẩn từ đất đang trong quá trình xử lý tẩy độc các chất ô nhiễm trên.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập các chủng vi sinh vật từ bioreactor hiếu khí

Đất nhiễm DDT tại làng Hoàng Trù, Kim Liên, Nam Đàn, Nghệ An đã được thu thập để xử lý theo phương pháp kích thích sinh học trong bioreactor hiếu khí 100 kg. Sau thời gian xử lý 15 ngày trong bioreactor, kết quả cho thấy không những DDT, DDD, DDE bị phân hủy mà các chất ô nhiễm khác như Dieldrin, Aldrin, Endrin và Heptachlor cũng bị loại bỏ ở mức độ khác nhau. Để đánh giá sự phân hủy chất độc của nấm và vi khuẩn trong bioreactor, đất sau 7 ngày xử lý được lấy mẫu để phân lập bằng phương pháp làm giàu 3 lần trên môi trường khoáng chứa DDT bổ sung 0,1% glucose. Các khuẩn lạc vi sinh vật được tách sạch trên môi trường rắn, đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển, sinh enzyme ngoại bào và sử dụng DDT trong môi trường dịch tương tự.

Khả năng sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật phân lập từ đất xử lý tẩy độc hỗn hợp thuốc trừ sâu trong đó có DDT

Dựa vào khả năng phát triển trên môi trường muối khoáng với nguồn carbon là hỗn hợp của DDT, DDD, DDE và 0,1% glucose, bốn chủng FNA1, FNA4, BNA71, BNA73 đã được chọn để tiến hành phân tích khả năng phân hủy sinh học các chất độc trên. Các bình nuôi cấy ở 30°C, 200 vòng/phút, sau 14 ngày mẫu được phân tích độ tồn lưu của các chất trên thiết bị GC-MS.

Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào

Hoạt tính của lignin peroxidase (LiP) được xác định dựa trên sự oxy hóa 2,4 - dichlorophenol (2,4-DCP) với sự có mặt của H₂O₂, biểu hiện bằng tăng mức độ hấp thụ ở bước sóng 510 nm (Macedo *et al.*, 1999).

Tương tự manganese peroxidase (MnP) cũng được xác định tương tự với cơ chất là phenol red và MnSO₄ tại bước sóng 610 nm, nhưng sau 1 phút thì dừng phản ứng bằng NaOH 5 M (Mercer *et al.*, 1996).

Hoạt tính laccase dựa trên sự oxy hóa syringaldazine thành sản phẩm oxy hóa, hấp thụ mạnh ở bước sóng 525 nm (Farnet *et al.*, 2002).

Các chủng nấm sau 14 ngày nuôi lác được thu dịch để xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

Phân loại nấm sợi

Quan sát hình thái khuẩn lạc chủng nấm sợi trên môi trường Czapek và cuống sinh bào tử chủng nấm sợi trên kính hiển vi điện tử quang học (Hoàng Thị Mỹ Hạnh *et al.*, 2004).

Xác định trình tự gen mã hóa 18S rRNA

Cặp mồi EF4f (ggaaggg(g/a)tgattattag) và Fung5r (gtaaagtctctggtccc) được sử dụng để nhân đoạn gen mã hóa 18S rRNA từ DNA tổng số của chủng FNA4 đã tách chiết và làm sạch theo Sambrook và Russell (2001). Sản phẩm PCR sau khi gắn vào vector pCR[®]2.1 và biến nạp vào tế bào *E. coli* INF α F' được tách, kiểm tra plasmid tái tổ hợp (Sambrook, Russell, 2001). Xác định trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA trên máy ABI PRISM 3100 Avant Data Collection v.1.0. và so sánh với các trình tự trên GenBank. Cây phát sinh chủng loại đoạn gen mã hóa 18S rRNA của chủng FNA4 và các chủng đại diện được xây dựng dựa trên các phần mềm Clustal X, NJ tree và Bioedit.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập các chủng vi sinh vật từ bioreactor hiếu khí

Từ mẫu đất xử lý sau một tuần hỗn hợp DDT, DDD, DDE, HCH... đã phân lập được 5 chủng nấm sợi và 3 chủng vi khuẩn. Các chủng nấm được đặt tên FNA1, FNA2, FNA3, FNA4 và FNA5 có hình thái khuẩn lạc khác nhau trên cả hai môi trường muối khoáng chứa DDT có bổ sung 0,1% glucose và môi trường Czapek. Trên môi trường Czapek, chủng FNA2 khuẩn lạc tròn, bề mặt chắc, khuẩn ty khí sinh (KTKS) màu xanh lá chuối và khuẩn ty cơ chất (KTCC) màu trắng; còn FNA5 khuẩn lạc mọc rộng, có 3 vòng, ở tâm là màu vàng xanh, vòng tiếp theo có màu trắng, vòng ngoài cùng có màu vàng, KTKS màu vàng, KTCC màu trắng. Ba chủng vi khuẩn BNA71, BNA72 và BNA73 cũng có màu sắc khác nhau trên môi trường muối khoáng với nguồn carbon là hỗn hợp DDT, DDD, DDE.

Khả năng sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật phân lập từ đất xử lý tẩy độc DDT

Từ 8 chủng vi sinh vật, dựa vào tốc độ phát triển nhanh và sự thay đổi màu môi trường nên chúng tôi đã chọn hai chủng nấm là FNA1, FNA4, và hai chủng vi khuẩn BNA71, BNA73; nuôi lác ở

200 vòng/phút, 30°C. Phân tích, đánh giá khả năng phân hủy DDT và các sản phẩm của các chủng nghiên cứu bằng sắc ký khối phổ (GC/MS). Kết

quả cho thấy cả 4 chủng vi sinh vật đều có khả năng phân hủy DDT, DDD, DDE ở mức độ khác nhau (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng phân hủy DDT, DDD, DDE bởi vi sinh vật.

	Mẫu	Mẫu không có VSV	FNA1	FNA4	BNA71	BNA73
Chi tiêu (ppm)						
DDE		60,5	11,2	4,5	52,0	49,8
DDD		58,4	9,2	3,1	45,8	41,8
DDT		42,2	6,5	1,1	40,2	35,1
Tổng DDT		52,6	9,0	2,9	46,0	42,2
Giảm (%)			83	94,5	12,5	19,7

Hai chủng nấm FNA1 và FNA4 có khả năng phân hủy > 80% hỗn hợp DDT, DDD, DDE. Đặc biệt, chủng FNA4 phân hủy 94,5% tổng hỗn hợp trên. Trong khi đó, hai chủng vi khuẩn chỉ có khả năng phân hủy 12,5 và 19,7%, kết quả này trùng với các công trình đã công bố liên quan đến khả năng phân hủy các hợp chất độc của vi khuẩn và khả năng này nấm sợi thường cao hơn hẳn vi khuẩn. Aust và đồng tác giả (1987) đã sử dụng nấm đảm loài *P. chrysosporium* nghiên cứu xử lý DDT, sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường thiếu nitrogen, khoảng 50% DDT đã được chuyển hóa, trong đó có 10% đã được khoáng hóa hoàn toàn và còn lại thấy xuất hiện các sản phẩm của quá trình trao đổi chất như dicofol, FW-152 và DBP (Aislabie *et al.*, 1997). Sử dụng một chủng nấm đảm khác để đánh giá khả năng phân hủy DDT, *Phanerochaete cordyline* được nuôi cấy song song với *P. chrysosporium*, sau 35 ngày, Water (1992) đã cho biết loài nấm này loại bỏ 80 - 90% lượng DDT đưa vào môi trường. Trên thực tế, sự chuyển hóa DDT bởi chủng nấm đảm này vẫn ở mức độ thấp vì vẫn phát hiện thấy DDD, DDE và 9 hợp chất không xác định (Aislabie *et al.*, 1997).

Vi khuẩn và xạ khuẩn thường phân hủy các loại chất độc thuộc POP thấp hơn nấm đảm. Aislabie và đồng tác giả (1999) đã sử dụng chủng *Terrabacter* sp. DDE-1 để nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học của vi khuẩn. Kết quả cho thấy, nồng độ DDE đã giảm từ 0,1 mg/ml xuống còn 0,062 mg/ml (48%) sau 10 ngày nuôi cấy.

Johnson và Kennedy (1973) đã nghiên cứu hiệu quả phân hủy DDT của *Aerobacter aerogenes* và

Bacillus subtilis lần lượt là 45 và 30% sau 24 h với nồng độ ban đầu là 5 µg/ml. Ngoài ra chủng *Ralstonia eutropha* A5 chuyển hóa DDT thành cis-2,3-Dihydrodiol DDT (Nadeau, 1998) còn *Pseudomonas acidovorans* M3GY chuyển hóa DDE thành 1,1-dichloro-2-(dihydroxy-4'-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl) ethylene (Aislabie *et al.*, 1999). Ở Việt Nam, Nghiêm Ngọc Minh và đồng tác giả (2007) đã nghiên cứu chủng *Streptomyces* sp. XKNA21 có khả năng phân hủy lần lượt 180, 550, 250 µg/ml DDT, DDE, 1-chloro-2,2-bis(pchlorophenyl) ethylene (DDMU).

Kết quả trình bày ở trên cho thấy, cả 2 chủng nấm và 2 chủng vi khuẩn phân lập được trong quá trình xử lý đất nhiễm hỗn hợp DDT, DDD, DDE, HCH... trong bioreactor hiếu khí đều có khả năng phân hủy sinh học thuốc diệt côn trùng ở mức độ khác nhau. Nấm có mức độ phân hủy tốt hơn vi khuẩn bởi vì nấm có hệ sợi thường sinh enzyme ngoại bào hoạt động tốt hơn vi khuẩn trong môi trường rắn. Tuy nhiên, để tìm hiểu con đường trao đổi chất của mỗi chủng trong 4 chủng VSV phân lập được, cần tiến hành những nghiên cứu tiếp theo mà hiệu quả hơn cả là sử dụng DDT, DDD và DDE là các chất được đánh dấu phóng xạ.

Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Ở điều kiện hiếu khí, nấm sợi phát triển mạnh, hệ khuẩn ty len lỏi khắp nơi trong môi trường, ngoài ra với khả năng phát triển ở pH thấp, sinh enzyme ngoại bào nên việc sử dụng nấm sợi trong công nghệ tẩy độc các chất hữu cơ ô nhiễm rất có triển vọng.

Theo các công bố mới đây của các nhà khoa học thì hệ enzyme ligninolytic ở các loài nấm đảm như *Phanerochaete*, *Trametes*, *Bjerkandera* và *Pleurotus* (Hestbjerg *et al.*, 2003; Levin *et al.*, 2003; Verdin *et al.*, 2004) có thể phân hủy những hợp chất hữu cơ gây ô nhiễm như DDT, PAHs, TNT, HCH... thành các hợp chất carbon đơn giản mà cơ thể sinh vật có thể sử dụng được. Có ba enzyme chính trong phân hủy lignin và các hợp chất tương tự là LiP, MnP và laccase. Cả ba loại enzyme này đều có khả năng được VSV sinh tổng hợp khi có mặt của chất dinh dưỡng trong môi trường (Mansur *et al.*, 2003). Những phản ứng chính mà hệ enzyme phân hủy lignin tham gia phản ứng xúc tác bao gồm depolymerization, demethoxylation, decarboxylation, hydroxylation và phản ứng mở vòng. Kết quả tạo thành một số gốc hoạt động mà có thể dễ dàng thực hiện các phản ứng tiếp theo để phân hủy chất gây ô nhiễm (Reddy *et al.*, 2001). Một phản ứng mở vòng hoàn thành tạo cơ hội để các loài nấm khác hay vi khuẩn trong tập đoàn vi sinh vật tại vị trí ô nhiễm sử dụng các sản phẩm trung gian, tiếp tục phân hủy để đi đến khoáng hóa hoàn toàn chất gây ô nhiễm.

Nhưng hiện nay, có rất ít công trình đã công bố về khả năng sinh enzyme ngoại bào của nấm sợi trong quá trình phân hủy sinh học các hợp chất POPs. Tuy nhiên, kết quả phân tích hóa học về khả năng phân hủy DDT, DDD, DDE của hai chủng nấm sợi là rất mạnh do vậy các chủng nấm sợi có khả năng sinh ra enzyme ngoại bào đã đề cập trên không? Để trả lời giả thiết trên, nghiên cứu xác định

các enzyme đóng vai trò quan trọng, nhất là LiP, MnP và laccase đã được tiến hành. Kết quả cho thấy 5 chủng đều sinh laccase, hai chủng FNA1, FNA2 sinh LiP còn FNA3 và FNA5 sinh MnP. Riêng FNA3 sinh enzyme MnP khá cao (Bảng 2).

Theo những kết quả đã công bố gần đây cho thấy, chỉ có một chủng nấm sợi có khả năng sinh enzyme ngoại bào là *Aspergillus terreus* LD-1. Chủng này sinh ra hai loại enzyme ngoại bào là MnP và laccase trong điều kiện kiềm (pH = 11 - 12.5), hoạt tính enzyme trung bình của hai loại enzyme này là 0,384 U/mg (Kanayama *et al.*, 2002).

Trên thực tế, hàm lượng enzyme peroxidase sinh ra trong nghiên cứu này trên môi trường phân hủy DDT và các dẫn xuất của nó chứ không phải trên môi trường giống như nuôi cấy *Aspergillus terreus* LD-1. Do đó, mở ra cơ hội để nâng cao hoạt lực enzyme khi chọn được môi trường tối ưu để sinh tổng hợp enzyme thô. Trong bài báo này, chúng tôi chỉ đánh giá một cách sơ bộ về khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng nấm trong môi trường chứa DDT, DDD, DDE mà chưa đi sâu vào đánh giá mối tương quan giữa khả năng phân hủy chất độc và khả năng sinh enzyme ngoại bào. Chủng FDN4 sinh enzyme ngoại bào yếu hơn FNA1 nhưng theo các công bố thì cùng một loại enzyme nhưng do các cơ thể bố mẹ khác nhau sinh ra thì khả năng phân hủy các chất ô nhiễm bền vững cũng khác nhau (Ruggaber, Talley, 2006). Do FNA4 có đặc tính nổi bật hơn các chủng khác nên đã được chọn để phân loại định tên.

Bảng 2. Hoạt lực enzyme ngoại bào của 5 chủng nấm.

Chủng \ Enzyme(U/l)	Lignin peroxidase	Manganese peroxidase	Laccase
FNA1	187,1	-	30,8
FNA2	34,6	-	33,8
FNA3	-	1076,0	9,2
FNA4	-	-	15,4
FNA5	-	470,8	12,3

Phân loại chủng nấm sợi FNA4

Một số đặc điểm hình thái của FNA4

Sau 3 ngày nuôi trên môi trường Czapek, khuẩn lạc chủng FNA4 có màu xanh rêu, bông xốp. Sau 6 ngày

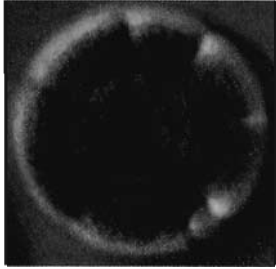
nuôi ở 30°C, khuẩn lạc chủng FNA4 có đường kính 2,5 cm, trung tâm phồng, bào tử nhiều, mặt trái có màu vàng nhạt, xuất hiện giọt tiết màu đen (Hình 2).

Chủng nấm sợi FNA4 có đầu sinh bào tử trần dạng tia, cuống sinh bào tử trần, có những đầu nhỏ có cuống

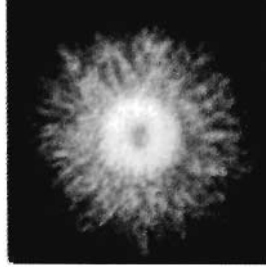
ngắn hoặc các thể bình đơn lẻ trên các sợi ngang, bông bán cầu đến cầu. Bào tử có hình cầu đến elip (Hình 3).

Các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử chủng nấm sợi FNA4 giống như các đặc điểm hình

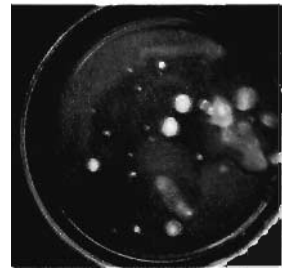
thái đã được mô tả của các đại diện thuộc chi *Aspergillus*. Để có được các kết quả chính xác về vị trí phân loại của FNA4, quá trình xác định trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA đã được tiến hành.



FNA2



FNA5

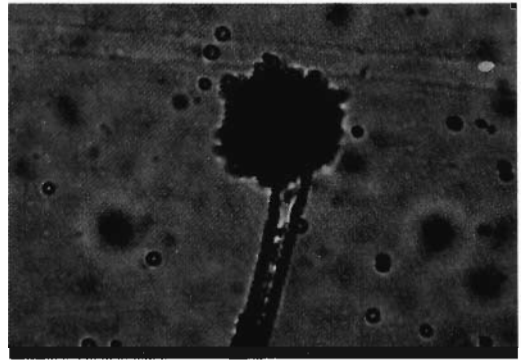


BNA71

Hình 1. Hình thái chủng nấm sợi FNA2, FNA5 và chủng vi khuẩn BNA71.



Hình 2. Khuẩn lạc chủng FNA4 trên môi trường Czapek sau 6 ngày.



Hình 3. Cuống sinh bào tử chủng FNA4.

Trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA

Kết quả tách chiết DNA tổng số từ chủng nấm sợi FNA4 có đủ độ sạch cần thiết phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Sản phẩm PCR có kết quả đặc hiệu khi nhân đoạn gen mã hóa 18S rRNA từ DNA tổng số của chủng này. Các bước thực hiện tiếp theo đã chọn được dòng DNA plasmid có khả năng mang đoạn gen mong muốn và được cắt bằng enzyme hạn chế *EcoRI* để giải trình tự.

Trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA này có kích thước 557 nucleotide và được đăng ký trên GenBank với mã số EU795695.

Kết quả so sánh với các trình tự đoạn gen 18S rRNA của các chủng nấm sợi đã công bố trên

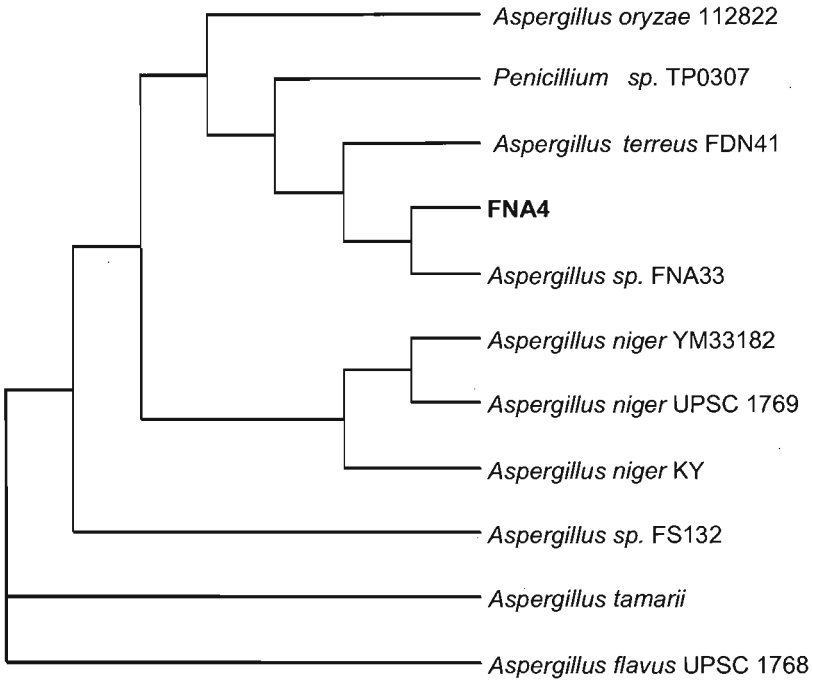
GenBank cho thấy, chủng FNA4 có mức tương đồng cao với các chủng nấm sợi thuộc ngành nấm nang *Ascomycetes*, ngành phụ *Pezizomycotina* và chi *Aspergillus* (Hình 4).

Như vậy, dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và so sánh một phần trình tự gen mã hóa 18S rRNA của chủng FNA4 thì chủng này có thể được xếp vào chi *Aspergillus* và được đặt tên là *Aspergillus* sp. FNA4.

Theo các công bố trước đây, đã có một số chủng nấm sợi có khả năng phân hủy DDT và chất có cấu trúc tương tự. *Aspergillus conicus* làm biến đổi 55,1% bis(4-chlorophenyl)acetic acid (DDA) thành các sản phẩm hòa tan trong nước chưa xác định và chưa chiết tách được. *Aspergillus niger* và *Penicillium*

brefeldianum chuyển hóa lần lượt 12,4 và 24,6% DDT thành các sản phẩm không xác định và hòa tan trong nước. 4-Chlorophenylacetic acid được hình thành từ quá trình phá hủy vòng bis (4-chlorophenyl) methane (DDM) bởi một loại nấm gây bệnh nấm than ở cây lúa. *Aspergillus niger* phân hủy 4, 4'-dichlorobenzophenone (DBP) thành 4-chlorobenzophenone và methylated 4-chlorobenzophenone. Ngoài ra, còn một số chủng như

A. flavus ATCC11495, *A. flavus* NRRL 1779 có khả năng chuyển hóa DBP thành các sản phẩm chưa được xác định có hàm lượng 1,6 và 4,8%. *A. niger* M chuyển hóa 35,2 % DBP thành một chất khác với thời gian lưu 171 giây (Subba-Rao, Alexander, 1985). Các minh chứng trên cho thấy vai trò rất quan trọng của nấm sợi, đặc biệt là các đại diện của chi *Aspergillus* trong phân hủy sinh học DDT và các sản phẩm trong chu trình khoáng hóa DDT ở môi trường rắn hiếu khí.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của chủng FNA4 và một số chủng FNA4 gần gũi.

Như đã đề cập ở trên, đất ô nhiễm hỗn hợp rất nhiều thuốc trừ sâu, ngoài DDT, DDD, DDE, HCH... cũng được xử lý khử độc bằng bioreactor hiếu khí. Vi sinh vật không chỉ phân hủy DDT mà chúng còn tấn công cả HCH và các chất ô nhiễm khác. Một số chủng nấm sợi có khả năng phân hủy HCH đã được phân lập. Chủng FNA33 có khả năng loại bỏ đến 88% HCH trong môi trường nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 243 ppm. Chủng này cũng đã được phân loại và có độ tương đồng cao với các đại diện của *Aspergillus* (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2009). Ngoài ra, chủng FNA33 cũng sinh 2 enzyme ngoại bào là laccase và manganese peroxidase.

Vậy chủng FNA4 có phân hủy HCH và các

thuốc trừ sâu khác tồn tại trong đất ở bioreactor hay FNA33 có chuyển hóa sinh học DDT không? Đây là những nghiên cứu cần phải tiếp tục thực hiện.

KẾT LUẬN

Số chủng nấm phân lập được ở bioreactor hiếu khí 100 kg nhiều hơn vi khuẩn, như vậy có thể nấm đóng vai trò quan trọng hơn vi khuẩn trong xử lý hiếu khí đất ô nhiễm DDT, DDD, DDE và một số chất khác.

Chủng nấm sợi FNA4 phân hủy 94,48% hỗn hợp DDT, DDD, DDE sau 14 ngày so với mẫu không có vi sinh vật.

Cả năm chủng nấm sợi FNA1, FNA2, FNA3, FNA4 và FNA5 phân lập được từ bioreactor hiệu suất 100 kg đều có khả năng sinh laccase (U/l) với hoạt lực lần lượt là 30,9; 33,8; 9,2; 15,4 và 12,3. Ngoài ra, hai chủng FNA1, FNA2 còn sinh enzyme lignin peroxidase (U/l) theo thứ tự 187,1 và 34,6. Hai chủng FNA3 và FNA5 sinh manganese peroxidase (U/l) với hoạt tính khá cao trong môi trường có DDT lần lượt 1076 và 470,8.

Chủng FNA4 được đặt tên là *Aspergillus* sp. FNA4 dựa trên các đặc điểm hình thái và trình tự đoạn gen 18S rRNA. Trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA được đăng ký trình tự trên GenBank với mã số EU795695.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài độc lập cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu xử lý tẩy độc một số hợp chất hữu cơ chứa clo bằng các phương pháp hóa học, sinh học tiên tiến”. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học trong việc xác định trình tự gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aislabie J, Davison AD, Boul HL, Franzmann PD, Jardine DR, Karuso P (1999) Isolation of *Terrabacter* sp. Strain DDE-1, which metabolizes 1,1-dichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethylene when induced with biphenyl. *Appl Environ Microbiol* 65: 5607-5611

Aislabie JM, Richards NK, Boul HL (1997) Microbial degradation of DDT and its residues-a review. *New Zealand J Agril Res* 40: 269-282.

Đặng Thị Cẩm Hà, Phạm Quốc Hiệp, Nguyễn Nguyễn Quang, Trần Thị Như Hòa, Nguyễn Ngọc Minh (2009) Phân lập, phân loại và đánh giá khả năng phân hủy hexachlorocyclohexane của chủng nấm sợi FNA33 từ đất xử lý khử độc thuốc trừ sâu bằng bioreactor hiệu suất. *Tap chí Công nghệ Sinh học*. Đã nhận đăng.

Farnet AM, Criquet S, Pocachard E (2002) Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter (*Quercus suber* L.). *Mycologia* 94(5): 735-740.

Francis AJ, Spangord RJ, Ouchi GI, Bramhall R, Bohonoset N (1976) Metabolism of DDT Analogues by a *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol* 32(2): 213-216.

Hestbjerg H, Willumsen PA, Christensen M, Andersen O, Jacobsen CS (2003) Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using *Pleurotus ostreatus* refuse from commercial mushroom production. *Environ Toxicol Chem* 22(4): 692-698.

Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thanh Thùy, Ngô Xuân Quý, Nguyễn Xuân Trường, Nguyễn Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2004) Khả năng phân hủy 2,4-D và dibenzofuran của chủng nấm sợi FDN20. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 2(4): 517-528.

Johnson BT, Kennedy JO (1973) Biomagnification of p, p'-DDT and Methoxychlor by Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 26(1): 66-71

Kanayama N, Suzuki T, Kawai K (2002) Purification and Characterization of an Alkaline Manganese Peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. *J Biosci Bioeng* 93(4): 405-410.

Levin L, Viale A, Forchiasin A (2003) Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Inter Biodeterior Biodegrad* 52: 1-5.

Macedo JMB, Gottschalk LMF, Bon EPS (1999) Calcium carbonate mediates higher lignin peroxidase activity in the culture supernatant of *Streptomyces Viridosporus* T7A. *Braz J Chem Eng* 16(2): 163-169.

Mansur M, Arias ME, Copa-Patiño JL, Flårdh M, González AE (2003) The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95(6): 1013-1020.

Mercer DK, Iqbal M, Miller PGG, Mccarthy AJ (1996) Screening Actinomycetes for Extracellular Peroxidase Activity. *Appl Environ Microbiol* 62(6): 2186-2190.

Nadeau LJ, Saylor GS, Spain JC (1998) Oxidation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Arch Microbiol* 171(1): 44-49.

Nguyễn Ngọc Minh, Cung Thị Ngọc Mai, Đặng Thị Cẩm Hà (2007) Phân loại chủng vi khuẩn BNA5 được phân lập từ đất nhiễm DDT bằng phương pháp phân tích trình tự nucleotit của gen 16S rRNA. *Tap chí Sinh học* 29(1): 76-81.

Reddy CA, Mathew Z (2001) *Bioremediation potential of white rot fungi. Fungi in bioremediation*. GM Gadd Cambridge, UK. Cambridge University Press.

Ruggaber TP, Talley JW (2006) Enhancing Bioremediation with Enzymatic Processes: A Review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 10(2): 73-85.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1st ed*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Subba-Rao RV, Alexander M (1985) Bacterial and fungal cometabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(pchlorophenyl) ethane (DDT) and its breakdown products. *Appl Environ Microbiol* 49: 509-516.

Verdin A, Sahraoui AL, Durand R (2004) Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Inter Biodeterior Biodegrad* 53: 65-70.

ISOLATION, CHARACTERISATION AND DEGRADATION OF DDT, DDD, AND DDE BY FILAMENTOUS FUNGI

Nguyen Nguyen Quang, Dang Thi Cam Ha*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Biotreatment of POPs is an effect method, which can mineralize harzadous pollutants without producing toxical secondary metabolites. Treatment of pollutants including DDT, DDD, DDE, HCH *etc.* at pilot scale was carried out in bioreactor containing 100 kg contaminated soil. Five filamentous fungal and two bacterial strains were isolated from treated soil samples collected after 7 days of biotreatment. Sequence of a 18S rRNA gene fragment of FNA4 was determined. Partial sequence of 18S rRNA gene of FNA4 has 99 - 100% homology to those of other representatives of *Aspergillus* genus. Based on morphological characteristics and as partial sequence of its 18S rRNA gene, FNA4 strain was classified and named as *Aspergillus* sp. FNA4. After 14 days cultivation, FNA4 degraded 94.48% mixture of DDT, DDD, and DDE with initial concentration of 52.57 ppm. Strain FNA4 produced extracellular enzyme laccase with activity 15.38 U/l. Four other isolated fungal strains produced laccase and lignin peroxidase or manganese peroxidase. Laccase activities of four strains FNA1, FNA2, FNA3, and FNA5 were 30.9; 33.8; 9.2; 12.3 U/l respectively. FNA1 and FNA2 produced lignin peroxidase with activities were 187.1 and 34.6 U/l. FNA3 and FNA5 produced manganese peroxidase with activities were 1,076; 470.8 U/l.

Keywords: *Bioreactor, DDT, extracellular enzyme, FNA4, 18S rRNA*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38360892; Fax: 84-4-38363144; E-mail: dangcamha@ibt.ac.vn