

## PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY HEXACHLOROCYCLOHEXANE CỦA CHỦNG NẤM SỢI FNA33 TỪ ĐẤT XỬ LÝ KHỬ ĐỘC THUỐC TRỪ SÂU BẰNG BIOREACTOR HIỆU KHÍ

Đặng Thị Cẩm Hà, Phạm Quốc Hiệp, Nguyễn Nguyên Quang, Trần Thị Như Hòa, Nghiêm Ngọc Minh

Viện Công nghệ sinh học

### TÓM TẮT

Từ mẫu xử lý khử độc đất nhiễm hỗn hợp các thuốc trừ sâu gồm Dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), Hexachlorocyclohexane (HCH), Dieldrin, Aldrin... trong bioreactor hiệu khí đã phân lập được ba chủng nấm sợi FNA31, FNA32 và FNA33. Các chủng nấm sợi đều phát triển được trong môi trường chỉ có muối khoáng chứa 300 ppm HCH. Chủng FNA33 có khả năng phát triển mạnh nhất so với hai chủng còn lại, do đó chủng FNA33 đã được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo. Dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, cuống sinh bào tử và bào tử, trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA chủng nấm sợi FNA33 được xếp vào chi *Aspergillus* và được đặt tên là *Aspergillus* sp. FNA33. Đoạn gen mã hóa 18S rRNA của chủng *Aspergillus* sp. FNA33 đã được đăng ký trên GenBank với mã số EU684231. Sau 14 ngày nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong môi trường muối khoáng có bổ sung 0,5% glucose, chủng nấm sợi FNA33 đã phân hủy được 88% HCH với nồng độ ban đầu là 243 ppm. Bước đầu nghiên cứu khả năng sinh enzyme ngoại bào cho thấy, sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường chứa HCH chủng nấm sợi FNA33 sinh tổng hợp hai loại enzyme là mangan peroxidase (434,5 U/l) và laccase (4,3 U/l), hoạt tính enzyme mangan peroxidase vẫn tồn tại trong môi trường sau 20 ngày nuôi cấy.

**Từ khóa:** Nấm sợi, phân hủy sinh học, thuốc trừ sâu, 18S rRNA

### MỞ ĐẦU

Việc sử dụng rộng rãi các thuốc bảo vệ thực vật chlorine hữu cơ ở nhiều nước đang phát triển như Việt Nam đã và đang dẫn đến tình trạng môi trường bị ô nhiễm do đặc tính khó phân hủy của chúng trong tự nhiên. Hexachlorocyclohexane (HCH) là một trong 12 hợp chất hữu cơ khó phân hủy nhóm POP được UNEP quy định phải quản lý an toàn và giảm thiểu theo công ước Stockholm 2001 mà Việt Nam đã ký (Dang Thi Cam Ha *et al.*, 2007). HCH thường tồn tại ở hai dạng chính là HCH kỹ thuật và HCH thương mại hay còn gọi là Lindane (ở Việt Nam gọi tắt là thuốc 666). Mặc dù HCH đã bị cấm sản xuất và sử dụng từ những năm 70 - 80 ở hầu hết các nước cũng như ở Việt Nam nhưng vẫn còn rất nhiều ở dạng quá hạn gây ô nhiễm môi trường đất, nước, không khí (Dang Thi Cam Ha *et al.*, 2007; Nguyễn Thúy Bình *et al.*, 2003). Các đồng phân của HCH xâm nhập và tích tụ trong cơ thể con người thông qua chuỗi thức ăn, đường hô hấp hay do tiếp xúc trực tiếp với nguồn ô nhiễm gây nên các căn bệnh nguy hiểm. Để giải quyết thực trạng ô nhiễm này, việc nghiên cứu tìm ra giải pháp xử lý, giảm thiểu và tẩy độc chất ô nhiễm là một nhiệm vụ hết sức cần thiết không chỉ ở nước ta mà còn nhiều

quốc gia trên thế giới. Cho đến nay, nhiều phương pháp hóa lý và sinh học đã được áp dụng để xử lý các chất độc thuộc POP trong có HCH. Phương pháp phân hủy sinh học được nhìn nhận là phương pháp hữu hiệu, không gây ô nhiễm thứ cấp cho môi trường và phù hợp cho việc khử độc với điều kiện kinh tế của các nước đang phát triển (Dang Thi Cam Ha *et al.*, 2007).

Các loài vi sinh vật đóng vai trò quan trọng nhất trong quá trình phân hủy sinh học. Các nhà khoa học đã chứng minh một số loài vi khuẩn như *Xanthomonas* sp. IHC12, *Microbacterium* sp. ITRC1; *Sphingomonas paucimobilis* UT26 và chủng *Sphingomonas paucimobilis* B90A đã khoáng hóa hoàn toàn các đồng phân HCH thành CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O (Nagata *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2002; Manickam *et al.*, 2007; Middeldorp *et al.*, 2005). Dựa trên những nghiên cứu về các gen chức năng và khả năng phân hủy của chủng B90A, thì chủng này có thể được sử dụng để loại bỏ HCH thông qua phương pháp kích thích sinh học (RupLal *et al.*, 2008). Một nghiên cứu gần đây của Benimeli và đồng tác giả (2006) đã thông báo về chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. M7 có khả năng phân hủy Lindane khi nuôi cấy trong môi trường chứa glucose 0,6 g/l và 100 mg/l Lindane

(Benimeli *et al.*, 2006). Bên cạnh đó, khả năng phân hủy HCH cũng đã được nghiên cứu ở điều kiện kỵ khí đặc biệt là trong hệ thống UASB bởi các loài vi sinh vật kỵ khí như là *Dehalobacter* sp., *Sedimentibacter* sp. ... (Doesburg *et al.*, 2005; Praveena *et al.*, 2008). Tuy nhiên, các nghiên cứu đều chứng minh rằng ở điều kiện kỵ khí không có sinh vật nào có thể khoáng hóa hoàn toàn các đồng phân HCH (Nagata *et al.*, 1999; Middeldorp *et al.*, 2005; Praveena *et al.*, 2008).

Một số chủng nấm đảm như *Phanerochaete*, *Trametes*, *Bjerkandera* và *Pleurotus* cũng có khả năng chuyển hóa và dẫn tới khoáng hóa hoàn toàn HCH nhờ hệ enzyme ngoại bào peroxidase (Mougin *et al.*, 1997; Singh, Kuhad, 2000; Rajashekara, Manonmani, 2007). Singh và Kuhad (2000) đã chứng minh loài *Phanerochaete chrysosporium* có khả năng phân hủy Lindane thấp hơn so với loài *Trametes hirsutus* sau 4 ngày nuôi cấy. Varima và đồng tác giả (2008) công bố chủng nấm sợi *Conidiobolus* 03-1-56 có khả năng phân hủy  $\gamma$ -HCH nhờ hệ enzyme ngoại bào cao hơn chủng nấm đảm *Pleurotus ostreatus* 1200, *Trametes versicolor* 1086 (Varima *et al.*, 2008). Tuy nhiên, số lượng các loài nấm sợi, đặc biệt là các chủng có khả năng sinh enzyme ngoại bào được phát hiện còn rất khiêm tốn, chưa phản ánh thực sự vai trò của nấm sợi trong chuyển hóa, phân hủy, khoáng hóa hoàn toàn các đồng phân của HCH. Hệ enzyme ngoại bào của các chủng nấm nói chung ngoài khả năng tham gia xúc tác các phản ứng phân hủy các hợp chất lignin chúng còn có khả năng phân hủy và khoáng hóa rất nhiều hợp chất thuộc POP hay các chất hữu cơ mạch vòng có cấu trúc giống thành phần cấu tạo nên phân tử lignin. Enzyme lignin peroxidase, mangan peroxidase và laccase đóng vai trò quan trọng nhất trong hai nhóm enzyme ngoại bào peroxidase và oxidoreductase. Đây là chìa khóa cho việc nghiên cứu sử dụng các loài vi nấm, đặc biệt là nấm sợi trong công nghệ phân hủy sinh học các chất hữu cơ gây ô nhiễm (Reineke, 2001; Dang Thi Cam Ha *et al.*, 2007; Mougin *et al.*, 1997; Rajashekara, Manonmani, 2007).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả phân lập và xác định khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào MnP và laccase và khả năng phân hủy HCH của chủng nấm sợi phân lập từ bioreactor hiếu khí xử lý đất nhiễm hỗn hợp thuốc trừ sâu HCH, DDT, Aldrin, Dieldrin... ở quy mô 100 kg đất.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nguyên liệu

Đất đang được xử lý khử độc hỗn hợp HCH, DDT,... trong bioreactor hiếu khí bằng phương pháp phân hủy sinh học (kích thích sinh học) đã được sử dụng để phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng phân hủy HCH. Sử dụng các môi trường muối khoáng và môi trường Czapek (Atlas, 1995) được cải tiến có chứa HCH kỹ thuật, đường glucose để nghiên cứu phân loại và phân hủy sinh học.

### Phương pháp nghiên cứu

Phân lập nấm bằng phương pháp cấy trải trên đĩa thạch với môi trường muối khoáng cơ bản chứa 100 ppm HCH. Sau đó, tiếp tục làm giàu 3 lần để chọn được chủng nấm có khả năng sử dụng HCH.

Hình thái cuống sinh bào tử và bào tử của chủng FNA33 được quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 40, 100 lần. Phương pháp phân loại dựa vào trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA được thực hiện như sau: tách chiết DNA tổng số, tách chiết DNA plasmid theo mô tả của Sambrook và Russell (2001), nhân đoạn gen 18S rRNA bằng kỹ thuật PCR với việc sử dụng cặp mồi EF4f và Fung5r (Elsas *et al.*, 2000), phương pháp tách dòng gen được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất TA Cloning® Kit (Introvigen™). Việc xác định trình tự được thực hiện theo phương pháp của Sanger, sử dụng máy xác định trình tự gen tự động ABI Prism 3100. Các bước tiến hành cụ thể đã được mô tả trong các công trình nghiên cứu trước đây (Hoàng Thị Mỹ Hạnh *et al.*, 2004; Nguyễn Thanh Thùy *et al.*, 2006).

Nghiên cứu, xác định hoạt tính enzyme ngoại bào thuộc nhóm peroxidase và laccase bằng phương pháp hấp thụ quang phổ ở các bước sóng thích hợp với các cơ chất phản ứng 2,4-DCP, phenol red, syringaldazine tương ứng cho mỗi loại enzyme (Derry *et al.*, 1996; Niladevi, Prena, 2005). Các chủng nấm sau 7 ngày và 20 ngày nuôi cấy được thu dịch để xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào.

Phân tích lượng tồn lưu HCH từ dịch nuôi cấy vi sinh vật được tiến hành như sau: thu nhận dịch nuôi cấy có chủng nấm sợi FNA33 và mẫu nuôi cấy không có vi sinh vật (đối chứng) có chứa HCH, tiến hành chiết hai lần bằng dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tách lấy phần dung môi có hòa tan HCH. Loại nước trong dung môi bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  khan sau đó cất quay chân không và chiết lại bằng dung môi n-hexane, tiếp tục

cát quay chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi n-hexane, lượng HCH tồn lưu được phân tích trên máy sắc ký khí khối phổ (GC/MS).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phát triển trên môi trường chứa HCH

Từ mẫu đất của bioreactor hiếu khí xử lý đất nhiễm hỗn hợp các thuốc trừ sâu trong đó có HCH, 3 chủng nấm, 2 chủng vi khuẩn đã được phân lập và tuyển chọn. Các chủng vi sinh vật có hình thái khác nhau trên môi trường muối khoáng chứa HCH không bổ sung glucose và trên môi trường tương tự có bổ sung có bổ sung 0,1%. Các chủng nấm sợi được đặt tên FNA31, FNA32, FNA33.

Sau 7 ngày nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C, khả năng phát triển của 3 chủng nấm FNA31, FNA32 và FNA33 trên môi trường muối khoáng dịch chứa 300 ppm HCH có bổ sung 0,1% glucose và không có glucose được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1.** Khả năng phát triển của 3 chủng nấm trên môi trường chứa HCH.

Chủng	Môi trường khoáng + HCH	
	Không có glucose	Có glucose
FNA31	+	++
FNA32	+	++
FNA33	++	+++

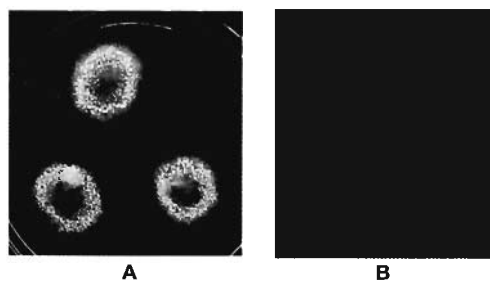
**Ghi chú:** (+): phát triển; (++): phát triển trung bình; (+++): phát triển tốt.

Kết quả thu được cho thấy, trên hai loại môi trường, cả 3 chủng đều phát triển. Khi môi trường có bổ sung glucose chúng có khả năng phát triển nhanh hơn. Chủng FNA33 có khả năng phát triển tốt hơn so với hai chủng còn lại nên đã được chọn để khảo sát các đặc điểm sinh học khác.

### Phân loại chủng nấm sợi FNA33 dựa trên các đặc điểm hình thái

Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường Czapek, khuẩn lạc chủng FNA33 có màu xanh rêu đậm, có viền sợi trắng xung quanh. Sau 7 ngày đường kính khuẩn lạc 2,5 cm, bề mặt phẳng dai, nhẵn nhéo có giọt tiết, bào tử chuyển sang màu đen, mặt trái lúc

đầu màu vàng nhạt sau màu vàng rom (Hình 1A). Đầu sinh bào tử trần dạng tia, cuống sinh bào tử trần có cuống dài, có các thể bình đơn lẻ trên thể bình lớn hình cầu. Hai tầng thể bình, cuống thể bình 6 - 9  $\mu\text{m}$   $\times$  3 - 3,5  $\mu\text{m}$ ; thể bình 7,5 - 9  $\mu\text{m}$   $\times$  3 - 3,5  $\mu\text{m}$ . Bào tử hình cầu, nhẵn 4  $\mu\text{m}$   $\times$  3,5 - 4,5  $\mu\text{m}$ , khi già gai ráp (Hình 1B). Xét các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, cuống sinh bào tử và bào tử thì chủng nấm sợi FNA33 có thể thuộc chi *Aspergillus*.

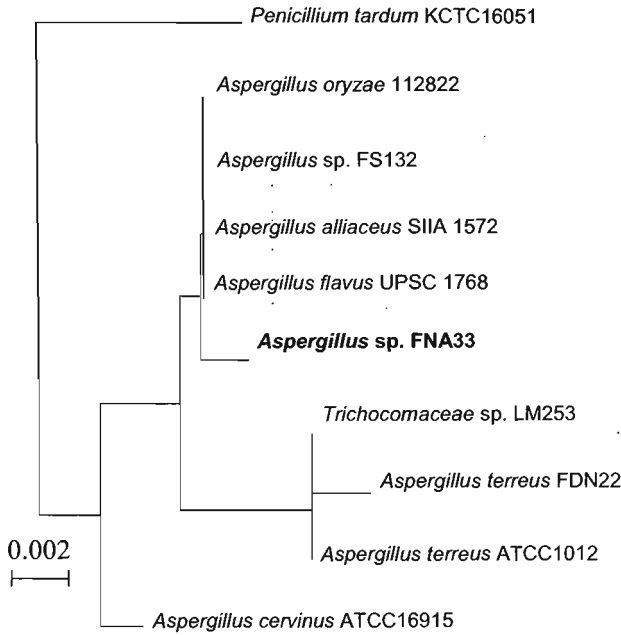


**Hình 1.** A. Hình thái khuẩn lạc trên Czapek; B. cuống sinh bào tử và bào tử của chủng nấm sợi FNA33.

### Phân loại FNA33 dựa trên trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA

Sau khi DNA tổng số đã được làm sạch, gen mã hóa 18S rRNA của chủng nấm sợi FNA33 đã được tách dòng và xác định, so sánh trình tự với các trình tự tương ứng của các chủng vi nấm đã được công bố trên GenBank. Chủng FNA33 có mức tương đồng tới 99% so với các đại diện thuộc chi *Aspergillus*, có mối qua hệ gần gũi với chi *Trichoderma* (98%), *Penicillium* (97%) (Hình 2). Dựa vào đặc điểm hình thái và kết quả so sánh trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA, chủng FNA33 được đặt tên là *Aspergillus* sp. FNA33. Trình tự đoạn gen này được đăng ký trên GenBank với mã số EU684231.

Chủng *Aspergillus* sp. FNA33 có quan hệ gần gũi với các chủng *Aspergillus oryzae* 112822, *Aspergillus* sp. FS132, *Aspergillus alliaceus* SIIA 1572, *Aspergillus flavus* UCSP1768 hay các chủng *Trichocomaceae* sp. LM253, *Penicillium tardum* KCTC 16051 (Hình 2). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có các thông tin về khả năng sử dụng hay phân hủy HCH của các chủng đại diện trên. Chỉ có một vài công bố nghiên cứu về chủng nấm sợi FDN20, *Aspergillus terreus* FDN22 có khả năng sử dụng chất diệt cỏ 2,4-Dichlorophenolxylicetic và dibenzofuran phân lập từ đất nhiễm chất độc hóa học (Nguyễn Thanh Thùy *et al.*, 2006; Hoàng Thị Mỹ Hạnh *et al.*, 2004).



**Hình 2.** Cây phát sinh chủng loại của chủng FNA33 (Thước đo thể hiện sự sai khác của 2 nucleotide trên 1000 nucleotide so sánh).

**Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng FNA33**

Để xác định khả năng sinh tổng hợp nhóm enzyme ngoại bào peroxidase và laccase của ba chủng nấm sợi, đặc biệt là chủng FNA33, dịch nuôi cấy của các chủng được thu nhận và tiến hành xác định hoạt tính enzyme trên máy quang phổ hấp thụ. Kết quả xác định khả năng sinh tổng hợp enzyme lignin peroxidase, mangan peroxidase và laccase của ba chủng nấm sợi FNA31, FNA32 và FNA33 được trình bày ở bảng 2.

Enzyme laccase đã được cả 3 chủng sinh tổng hợp sau 7 ngày và đều giảm hoặc mất hoạt tính sau ngày thứ 20. Sau 7 ngày nuôi cấy, chủng FNA33 đã sinh tổng hợp enzyme mangan peroxidase với hoạt tính khá cao 434,5 U/l còn enzyme laccase có hoạt tính thấp hơn (4,30 U/l). Sau 20 ngày thì hoạt tính của enzyme MnP và laccase không còn phát hiện được. Chủng FNA32 sinh tổng hợp enzyme lignin peroxidase sau 20 ngày nuôi cấy, cũng trong thời gian này, enzyme mangan peroxidase của chủng FNA31 được phát hiện với hoạt tính 168 U/l nhưng vẫn thấp hơn chủng FNA33 là 269 U/l. Nghiên cứu bước đầu cho thấy sự đa dạng trong khả năng trao

đổi chất của cả 3 chủng nấm, đồng thời các enzyme được sinh ra sau 7 ngày và vẫn tồn tại sau 20 ngày.

**Bảng 2.** Hoạt tính enzyme ngoại bào LiP, MnP, Lac của các chủng nấm sợi.

Tên chủng	Sau 7 ngày			Sau 20 ngày		
	LiP	MnP (U/l)	Lac	LiP	MnP (U/l)	Lac
<b>FNA31</b>	-	-	4,0	-	168	0,9
<b>FNA32</b>	-	-	12,3	110,8	-	2,3
<b>FNA33</b>	-	434,5	4,3	-	269	-

**Ghi chú:** (U/l): đơn vị đo enzyme sinh ra trong 1 l dịch môi trường nuôi cấy; (-): không sinh enzyme.

Ba loại enzyme ngoại bào đã được tìm thấy ở ba chủng nấm sợi trong nghiên cứu này mở ra một hướng mới cho việc xử lý hỗn hợp POP ở trong đất với các nồng độ khác nhau bằng nấm sợi trong bioreactor hiếu khí, khi các yếu tố môi trường có thể điều khiển được. Đây là bước khởi đầu để có thể thực hiện các nghiên cứu sâu hơn, hướng tới xây dựng các quy trình xử lý đất, trầm tích, nước ô

nhằm không chỉ cho HCH mà còn cho các loại POP khác như dioxin, PAH, PCB... Các enzyme này không đặc hiệu cho từng loại POP và là hệ enzyme ngoại bào nên mở ra triển vọng để tăng cường hiệu quả xử lý hỗn hợp POP trong đó có thuốc trừ sâu có chứa gốc chlorine.

Ở điều kiện hiếu khí, trong lên men pha rắn thì nhóm enzyme ngoại bào thường được sinh tổng hợp nhiều hơn là enzyme nội bào, điều này cũng giải thích khả năng khoáng hóa HCH hay các hợp chất phenolic nhờ hệ enzyme này và chỉ có thể xảy ra ở điều kiện hiếu khí (Singh, Kuhad, 2000; Reineke, 2002; Timothy, Jeffer, 2006). Khi phát triển trong các loại môi trường rắn khác nhau, các chủng nấm sợi thuận lợi hơn vì khuẩn vì chúng có hệ sợi và còn có khả năng sinh tổng hợp các enzyme không đặc hiệu khác như monooxygenase, dehydrogenase, oxidoreductase tăng cường xúc tác phản ứng sinh học (Reineke, 2001; Timothy, Jeffer, 2006). Các hệ enzyme ngoại bào mà nấm sợi sinh ra không chỉ ở điều kiện *in vitro* mà ngay những điều kiện *in vivo* cũng được kích thích nhờ các yếu tố dinh dưỡng hay nhu cầu cho và nhận điện tử. Các minh chứng trên góp phần giải thích sự xuất hiện các chủng nấm sợi có khả năng phát triển mạnh và hoàn toàn chiếm ưu thế khi xử lý bằng phương pháp phân hủy sinh học trong bioreactor hiếu khí sau 7 đến 15 ngày (Dang Thi Cam Ha *et al.*, 2007). Chắc chắn tập đoàn nấm sợi đóng một vai trò nhất định trong giai đoạn đầu khi xử lý nhằm chuyển hóa, phân hủy và khoáng hóa hỗn hợp các chất độc thuộc nhóm POP trong đó có HCH. Có thể enzyme ngoại bào ở nấm sợi trong điều kiện hiếu khí đóng vai trò chủ đạo, đây là một vấn đề cần có thêm các nghiên cứu khẳng định (Dang Thi Cam Ha *et al.*, 2007).

Trong các nghiên cứu về enzyme ngoại bào thủy phân hợp chất lignin ở nấm sợi phân lập từ đất, chủng nấm sợi *Aspergillus terreus* LD-1 gần gũi với chủng *Aspergillus sp.* FNA33 đã được công bố, đặc biệt chủng này sinh tổng hợp 2 loại enzyme tương tự như chủng *Aspergillus sp.* FNA33. Hai enzyme thu được có khả năng hoạt động ở điều kiện rất kiềm pH từ 11 đến 12,5, hoạt tính enzyme trung bình 0,384 U/mg đối với từng loại cơ chất dùng để xác định (Kanayama *et al.*, 2002). Ngoài ra, 3 loài nấm *Aspergillus nidulan*, *A. oryzae*, *A. niger* cũng được sử dụng làm vật chủ để biểu hiện các gen mã hóa cho các enzyme ngoại bào peroxidase và laccase từ các chủng nấm đảm *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Cyathus bulleri*, *Trametes sp.* ... (Singh, Kuhad, 2000; Reineke, 2001). Các enzyme

ngoại bào đặc biệt được quan tâm và có ứng dụng nhiều nhất cho xử lý các hợp chất xenobiotic là laccase và mangan peroxidase (Timothy, Jeffer, 2006).

### Khả năng phân hủy HCH của chủng nấm sợi FNA33

Khả năng phân hủy HCH của chủng nấm sợi đã được nghiên cứu để phân nào lý giải mối quan hệ giữa hệ enzyme ngoại bào được sinh tổng hợp trong môi trường và phân hủy HCH. Kết quả phân tích lượng HCH còn lại trong mẫu nuôi cấy chủng nấm sợi FNA33 trên môi trường muối khoáng có bổ sung 0,5% glucose so sánh với mẫu tương tự không có FNA33 được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3.** Khả năng phân hủy HCH của chủng nấm sợi FNA33.

HCH (ppm)	Mẫu phân tích		Lượng HCH bị loại bỏ (%)
	không có FNA33	Có FNA33	
$\alpha$ -HCH	0,8	0,3	65,0
$\gamma$ -HCH	241,7	28,8	88,1
$\delta$ -HCH	0,5	0,06	88,5
Tổng số	243	29,1	88,0

Sau 14 ngày nuôi cấy, chủng nấm sợi FNA33 đã phân hủy, loại bỏ 88,0% lượng HCH trong môi trường nuôi cấy. Tốc độ phân hủy HCH bởi chủng nấm sợi *Aspergillus sp.* FNA33 khá cao.

Trong các công trình đã công bố về khả năng phân hủy HCH bởi nấm sợi cho thấy một vài loài có khả năng chịu đựng trong môi trường có nồng độ HCH thấp như *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium camemberti*, *Aspergillus awamori*, *Thermoascus aurantiacus* nhưng chưa có nhiều minh chứng thuyết phục về khả năng phân hủy HCH (Mougin *et al.*, 1997; Singh, Kuhad, 2000; Reineke, 2001).

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thúy Bình và đồng tác giả (2003), chủng nấm sợi *Aspergillus niger* IFO 31125 và chủng No2-500 có khả năng chịu đựng độc tính của  $\gamma$ -HCH lần lượt là 1, 2, 3 ppm. Sau 10 ngày, hai chủng này chuyển hóa được khoảng 80% với nồng độ ban đầu là 1,0 ppm (Nguyễn Thúy Bình *et al.*, 2003). Còn chủng *Aspergillus sp.* FNA33

trong nghiên cứu này có khả năng phân hủy mạnh hơn hai chủng trên khoảng 200 lần.

Gupta và đồng tác giả (2000) khi nghiên cứu khả năng phân hủy HCH ở 2 chủng *Bacillus circulans* và *Bacillus brevis*, sau 2 năm nuôi cấy tích lũy, chúng cũng đã phân hủy được các đồng phân HCH với nồng độ ban đầu rất thấp 1,0 ppm (Gupta *et al.*, 2000). Một nghiên cứu khác ở chủng *Pseudomonas aeruginosa* ITRC5, Kumar đã xác định được trên 90% đồng phân  $\alpha$ ,  $\gamma$ -HCH, 45%  $\beta$ -HCH, 55%  $\delta$ -HCH được loại bỏ khi sử dụng chủng này để xử lý HCH trong đất bị ô nhiễm (Kumar *et al.*, 2006). Một công bố khác về khả năng phân hủy  $\gamma$ -HCH của chủng *Xanthomonas* sp. ICH12, tác giả Manickam cho biết chủng ICH12 sử dụng  $\gamma$ -HCH như là nguồn carbon và năng lượng duy nhất trong suốt quá trình phát triển. Sau 8 ngày, chủng này phân hủy được 100 ppm  $\gamma$ -HCH và lượng sinh khối cao nhất thu được trong ngày nuôi cấy thứ 6 (Manickam *et al.*, 2007). Singh và Kuhad (2000) so sánh khả năng phân hủy HCH của hai chủng nấm đảm *Phanerochaete sordida* và *Cyathus bulleri* đã kết luận rằng khi nuôi cấy trong môi trường có nguồn carbon thứ hai là glucose thì các đồng phân HCH mới bị phân hủy. Sau 4 ngày nuôi cấy, hai chủng này bắt đầu phân hủy  $\gamma$ -HCH có trong môi trường với nồng độ ban đầu là 79,4 ppm (Singh, Kuhad, 2000).

So sánh với những kết quả về khả năng phân hủy HCH của vi sinh vật mà chúng tôi được biết thì chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. FNA33 có tốc độ phân hủy tương đối cao, sau 2 tuần 213,9 ppm HCH đã bị loại bỏ. Ngoài ra, một số chủng nấm sợi khác có khả năng phân hủy DDT cũng đã được phân lập từ bioreactor hiếu khí xử lý đất nhiễm hỗn hợp nhiều loại thuốc trừ sâu. Một trong số đó là chủng *Aspergillus* sp. FNA4 đã loại bỏ được 94,5% hỗn hợp DDT, DDD, DDE với nồng độ ban đầu là 52.6 ppm (Nguyễn Nguyên Quang, Đặng Thị Cẩm Hà, 2009). Chủng FNA4 cũng đã được khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào và chỉ có enzyme laccase được tìm thấy, hoạt tính enzyme là 15,4 U/l cao hơn so với chủng FNA33 (4,3 U/l). Điều này cũng có thể giải thích được rằng vi sinh vật không chỉ phân hủy HCH mà chúng còn có khả năng phân hủy DDT và các thuốc trừ sâu khác. Từ đặc tính phân hủy các đồng phân HCH trong môi trường nuôi cấy đã chứng minh được chủng nấm sợi FNA33 đóng một vai trò nhất định trong quá trình phân hủy hỗn hợp các thuốc trừ sâu trong đất ô nhiễm xử lý bằng bioreactor hiếu khí.

## KẾT LUẬN

Năm chủng vi sinh vật có khả năng sử dụng HCH đã được phân lập, trong đó có 3 chủng nấm sợi FNA31, FNA32 và FNA33. Chủng nấm sợi FNA33 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt hơn so với hai chủng nấm sợi còn lại.

Trên môi trường muối khoáng dịch có chứa HCH ở ngày nuôi cấy thứ 7, chủng *Aspergillus* sp. FNA33 sinh tổng hợp 2 loại enzyme ngoại bào là mangan peroxidase và laccase với hoạt tính lần lượt là 434,5 U/l, 4,3 U/l. Enzyme laccase cũng được sinh tổng hợp bởi hai chủng nấm sợi FNA31 (4,0 U/l) và FNA32 (12,3 U/l) Chủng nấm sợi FNA32 sinh tổng hợp enzyme lignin peroxidase (118,8 U/l) ở ngày nuôi cấy thứ 20, ở cùng thời điểm này enzyme mangan peroxidase cũng được sinh ra từ chủng FNA31 có hoạt tính 168 U/l nhưng vẫn thấp hơn chủng FNA33 là 269 U/l.

Sau 14 ngày nuôi cấy chủng *Aspergillus* sp. FNA33 loại bỏ được 88% HCH với nồng độ ban đầu 243 ppm. Chủng nấm sợi FNA33 được xếp vào chi *Aspergillus*, được đặt tên là *Aspergillus* sp. FNA33, trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA được đăng ký trên GenBank với mã số EU684231.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện với tài 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 phương pháp hóa học, sinh học tiên tiến".

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Atlas RM (1995) *Handbook of Media for Environmental Microbiology*, CRC press, Boca Raton, Florida.
- Benimeli CS, Castro GR, Chaile AP, Amoroso MJ (2006) Lindane removal induction by *Streptomyces* sp. M7. *J Basic Microbiol* 46 (5): 348-57.
- Dang Thi Cam Ha, Nguyen Ba Huu, Nghiem Ngoc Minh, Nguyen Nguyen Quang, Nguyen Thanh Thuy, Dam Thuy Hang, Tran Nhu Hoa, Nguyen Ngoc Bao (2007) Application of bioremediation technology for detoxification of herbicide/dioxin contaminated soil. In proceedings: "9<sup>th</sup> International HCH and Pesticides Forum for CEECCA countries" Sept. 20 - 22, 2007, ISBN 978-9975-70-707-7: 270-274.
- Derry KM, Iqbal M, Miller PGG, McCathy A (1996) Screening Actinomycetes for extracellular Peroxidase Activity. *J Appl Environ Microbiol* 62: 2186-2190.



- Doesburg WV, Miriam HA van Eekert, Middeldorp PJM, Balk M, Gosse S, Alfons JM (2005) Reductive dechlorination of  $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(5): 80-88.
- Elsas JD, Duarte GF, Keizer-Wolters A, Smit E (2000) Analysis of dynamics of fungal communities in soil via fungal specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Method* 43: 133-151.
- Gupta A, Kaushik CP, Kaushik A (2000) Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH. *Soil Biol Biochem* 32: 1803-1805.
- Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thanh Thủy, 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.
- 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.
- Kumar M, Gupta SK, Garg SK and Kumar A (2006) Biodegradation of hexachlorocyclohexane-isomers in contaminated soils. *Soil Biol Biochem* 38: 2318-2327.
- Manickam N, Misra R, Mayilraj S (2007) A novel pathway for the biodegradation of  $\gamma$ -HCH by *Xanthomonas* sp. Strain ICH12. *J App Microbiol* 102: 1468-1478.
- Middeldorp PJM, Doesburg WV, Gosse S, Alfons JM (2005) Reductive dechlorination of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers in soil under anaerobic condition. *Biodegradation* 16: 283-290.
- Mougin C, Peri Caud C, Dubroca J, Asther M (1997) Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol Biochem* 29(9-10): 1321-1324.
- Nagata Y, Miyuchi R, Tagaki M (1999) Complete analysis of gens and enzyme for  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *India J Microbiol Biotechnol* 23: 380-390.
- Nguyễn Nguyên Quang, Đặng Thị Cẩm Hà (2009) Phân lập, phân loại và khả năng phân hủy DDT, DDD, DDE của chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. FNA4. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 7(1): 125-132.
- Nguyễn Thúy Bình, Đặng Đức Nhận, Đỗ Thị Loan, Đinh Thu Hằng, Nguyễn Ngọc Dũng, Văn Như Ngọc, Trần Văn Nhị (2003) Nghiên cứu khả năng chịu đựng và chuyển hóa Lindane ( $\gamma$ -HCH) của một số vi sinh vật. *Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc*: 172-174.
- Niladevi KN, Prena P (2005) Mangrove Actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica* 19: 40-47.
- Praveena B, Suresh Kumar M, Sandeep M, Tapan C (2008) Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane in upflow anaerobic sludge blanket reactor using methanol as an electron donor. *Bioresour Technol* 99(7): 2594-2602.
- Rajashekara MHM, Manonmani HK (2007) Aerobic degradation of technical hexachlorocyclohexane by a defined microbial consortium. *J Hazardous Material* 149: 18-25.
- Reineke W (2001) *The Handbook of Environmental Chemistry* Vol. 2 Part K. *Biodegradation and Persistence*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Singh BK, Kuhad RC (2000) Degradation of insecticide lindane ( $\gamma$ -HCH) by white-rot fungi *Cyathus bulleri* and *Phanerochaete sordida*. *Pest Manage Sci* 56: 142-146.
- Timothy PR, Jeffer WT (2006) Enhancing bioremediation with enzymatic processes: A review. *Pratice periodical of hazardous, toxic and radioactive waste Management* 10: 73-85.
- Varima N, Scrinivasan MC, Paknikar KM (2008) Biodegradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane (lindane) by non-white rot fungus *Conidiobolus* 03-1-56 isolated from litter. *India J Microbiol* 48: 134-141.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEGRADATION OF FILAMENTOUS FUNGAL STRAIN FNA33 FROM PESTICIDE DETOXIFICATION BY AEROBIC BIOREACTOR

Dang Thi Cam Ha\*, Pham Quoc Hiep, Nguyen Nguyen Quang, Tran Thi Nhu Hoa, Nghiem Ngoc Minh

Institute of Biotechnology

### SUMMARY

Three filamentous fungal strains were isolated of soil bioremediation treatment by aerobic bioreactor in order to detoxify DDT, HCH and other pesticides. These fungal strains FNA31, FNA32 and FNA33 cultivated in mineral salt medium containing 300 ppm HCH and FNA33 showed the best growth. Based on colony morphology, sporephore observed through microscope and sequence of a partial 18S rRNA gene, the strain FNA33 could be classified *Aspergillus* sp. FNA33. The 18S rRNA gene fragment sequence of *Aspergillus* sp. FNA33 was deposited in the GenBank database with accession number EU684231. After 14 days incubation in mineral salt medium containing 0.5% glucose, *Aspergillus* sp. FNA33 degraded 88% HCH with initial concentration 243 ppm. Furthermore, after 7 days in the same condition this strain also produced extracellular enzyme mangan peroxidase (434.5 U/l) and laccase (4.3 U/l). After 20 days of cultivation the activity of manganese peroxidase detected still at high level (269 U/l).

**Keywords:** *Aspergillus*, bioremediation, hexachlorocyclohexane, filamentous fungi, 18S rRNA

---

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-38360892; Fax: 84-4-38363144; E-mail: [dangcamha@ibt.ac.vn](mailto:dangcamha@ibt.ac.vn)