

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

-----///-----

Đào Thị Ngọc Ánh

**NGHIÊN CỨU PHÂN LOẠI, KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DDT
VÀ SINH LACCASE CỦA CHỦNG NẤM SỢI PHÂN LẬP TỪ ĐẤT
Ô NHIỄM HỖN HỢP THUỐC TRỪ SÂU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2009

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

-----//-----

Đào Thị Ngọc Ánh

**NGHIÊN CỨU PHÂN LOẠI, KHẢ NĂNG PHÂN HỦY
DDT VÀ SINH LACCASE CỦA CHỦNG NẤM SỢI
PHÂN LẬP TỪ ĐẤT Ô NHIỄM HỖN HỢP THUỐC TRỪ SÂU**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số : 60.42.30

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS.TS **Đặng Thị Cẩm Hà**

Thái Nguyên - 2009

Lời Cảm Ơn !

*Trong quá trình nghiên cứu vừa qua, tôi gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến sự hướng dẫn, chỉ bảo tận tình của **PGS.TS. Đặng Thị Cẩm Hà**, và các anh chị trong nhóm nghiên cứu Công nghệ sinh học xử lý khử độc các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy, phòng Công nghệ Sinh học Môi trường, đặc biệt là **Ths. Nguyễn Bá Hữu, KS. Đàm Thúy Hằng, KS. Nguyễn Nguyễn Quang, KS. Nguyễn Quang Huy**.*

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới Khoa sau đại học, Khoa Sinh-Kỹ thuật nông nghiệp – Trường đại học Sư phạm – Đại Học Thái Nguyên và lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã tận tình dạy dỗ và tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành khóa học và thực hiện luận văn này.

Bên cạnh đó, tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình và bạn bè đã tạo điều kiện động viên giúp đỡ tôi cả về vật chất và tinh thần để tôi có thể hoàn thành bản luận văn này.

Hà Nội, ngày 25 tháng 10 năm 2009

Đào Thị Ngọc Ánh

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

| | |
|--------------|--|
| 2,4-D | 2,4,- dichlorophenoxyacetic acid |
| 2,4,5-T | 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid |
| 2,3,7,8-TCDD | 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin |
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) |
| bp | Base pair |
| DDE | Dichlorodiphenyldichloroethylene |
| DDD | Dichlorodiphenyldichloroethane |
| DDT | Dichloro - Trichloroethane Diphenyl |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| EC | Enzyme Commission |
| EPA | U.S. Environmental Protection Agency |
| HCH | Hexacyclohexan |
| Lac | Laccase |
| LB | Luria - Bertani |
| LiP | Lignin peroxidase |
| MnP | Manganese peroxidase |
| PAH | Polycyclic aromatic hydrocarbon |
| PCB | Polychlorinated biphenyl |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| POP | Persistent Organic Pollutant |
| RBBR | Remazol brilliant blue R |
| RNA | Ribonucleic acid |
| rRNA | Ribosomal ribonucleic acid |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-indodyl- β galactosidase |

MỤC LỤC

| | |
|--|----|
| MỤC LỤC | 1 |
| MỞ ĐẦU | 4 |
| PHẦN I TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 6 |
| 1 ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC VÀ TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA DDT | 6 |
| 1.1 Cấu trúc của DDT | 6 |
| 1.2 Tính chất lý hóa của DDT | 6 |
| 2 ẢNH HƯỞNG ĐẾN MÔI TRƯỜNG VÀ SỨC KHỎE CON NGƯỜI CỦA DDT | 7 |
| 2.1 Ảnh hưởng đến môi trường | 7 |
| 2.2 Ảnh hưởng đến sức khỏe con người | 9 |
| 3 TÌNH TRẠNG Ô NHIỄM DDT | 11 |
| 3.1 Nguồn gốc phát sinh | 11 |
| 3.2 Tình trạng ô nhiễm DDT trên thế giới | 13 |
| 3.3 Tình trạng ô nhiễm DDT ở Việt Nam | 14 |
| 4 CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ Ô NHIỄM DDT | 16 |
| 4.1 Các phương pháp cơ, hóa lý | 16 |
| 4.1.1 Phương pháp chôn lấp, cô lập | 16 |
| 4.1.2 Phương pháp đốt có xúc tác | 17 |
| 4.1.3 Phương pháp phân hủy bằng kiềm nóng | 17 |
| 4.2 Phương pháp phân hủy sinh học | 18 |
| 5 PHÂN HỦY SINH HỌC DDT | 20 |
| 5.1 Khả năng phân hủy DDT bởi vi sinh vật | 20 |
| 5.1.1 Loại clo bởi quá trình khử | 21 |
| 5.1.2 Khoáng hoá DDT bởi nấm thủy phân lignin | 22 |
| 5.1.3 Phân hủy DDT bởi vi khuẩn trong điều kiện hiếu khí | 23 |
| 5.2 Các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến phân hủy sinh học DDT và các dẫn xuất của DDT | 26 |
| 6 LACCASE | 27 |
| 6.1 Định nghĩa | 27 |
| 6.2 Cấu trúc phân tử của laccase | 28 |
| 6.3 Cơ chế xúc tác của laccase | 30 |
| 6.4 Tính chất hóa sinh của laccase | 32 |
| 6.5 Sự phân bố và một số vi sinh vật sinh laccase | 33 |
| 6.6 Gene mã hóa laccase | 34 |
| 6.7 Ứng dụng của laccase | 36 |
| 6.8 Lignin peroxidase và Mangan peroxidase | 37 |
| 6.8.1 Lignin peroxidase | 37 |
| 6.8.2. Mangan peroxidase | 38 |
| 7 PHÂN LOẠI VI SINH VẬT | 39 |
| 7.1 Phân loại theo phương pháp truyền thống | 39 |
| 7.2 Phân loại bằng phương pháp xác định và so sánh trình tự gene mã hóa 18S Rrna | 39 |

| | | |
|---|--|----|
| 7.2.1 | Một số phương pháp phân loại bằng sinh học phân tử | 39 |
| 7.2.2 | Phân loại dựa vào trình tự gene mã hoá 18S rRNA | 40 |
| PHẦN II VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | | 42 |
| 1 | VẬT LIỆU | 42 |
| 1.1 | Nguyên liệu | 42 |
| 1.2 | Hóa chất | 42 |
| 1.3 | Thiết bị | 42 |
| 1.4 | Môi trường nuôi cấy | 43 |
| 2 | PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 45 |
| 2.1 | Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của các chủng nấm sợi | 45 |
| 2.2 | Sàng lọc khả năng sinh Lac, LiP, MnP | 45 |
| 2.3 | Nghiên cứu khả năng phân hủy DDT của chủng FNA1 | 45 |
| 2.4 | Phương pháp xác định hoạt tính enzyme | 46 |
| 2.4.1 | Xác định hoạt tính laccase | 46 |
| 2.4.2 | Xác định hoạt tính LiP | 47 |
| 2.4.3 | Xác định hoạt tính MnP | 47 |
| 2.5 | Khảo sát các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến khả năng phát triển và sinh laccase của chủng FNA1 | 48 |
| 2.6 | Xác định một số tính chất hóa sinh của laccase thô | 49 |
| 2.7 | Phân loại nấm sợi dựa vào xác định và so sánh trình tự gen mã hóa 18S rRNA | 50 |
| 2.7.1 | Tách DNA tổng số từ nấm sợi | 50 |
| 2.7.2 | Nhân đoạn gen bằng kỹ thuật PCR | 51 |
| 2.7.3 | Gắn sản phẩm PCR vào vector và biến nạp vào <i>E.coli</i> | 53 |
| 2.7.4 | Tách chiết DNA plasmid | 53 |
| 2.7.5 | Kiểm tra plasmit mang sản phẩm PCR mong muốn | 54 |
| 2.7.6 | Điện di kiểm tra DNA tổng số | 55 |
| 2.6.8 | Xây dựng cây phát sinh chủng loại | 55 |
| 2.6.7 | Xác định trình tự đoạn gene mã hóa 16S rRNA | 55 |
| PHẦN 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | | 56 |
| 1 | MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI KHUẨN LẠC VÀ CUỒNG SINH BÀO TỬ CỦA CÁC CHỦNG FNA1, FNA2, FNA3 | 56 |
| 2 | SÀNG LỌC KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP Lac, LiP, MnP | 57 |
| 3 | KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DDT CỦA CHỦNG FNA1 | 59 |
| 4 | CÁC ĐIỀU KIỆN MÔI TRƯỜNG ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ SINH TỔNG HỢP LACCASE CỦA CHỦNG FNA1 | 64 |
| 4.1 | <i>Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH môi trường nuôi cấy, nồng độ NaCl</i> | 64 |
| 4.1.1 | <i>Ảnh hưởng của nhiệt độ</i> | 64 |
| 4.1.2 | <i>Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy</i> | 65 |
| 4.1.3 | <i>Ảnh hưởng của nồng độ NaCl</i> | 67 |
| 4.2 | <i>Ảnh hưởng của nồng độ DDT và nồng độ glucose</i> | 68 |
| 4.2.1 | <i>Ảnh hưởng của nồng độ DDT</i> | 68 |
| 4.2.2 | <i>Ảnh hưởng của nồng độ glucose</i> | 69 |

| | |
|---|-----|
| 4.3 Ảnh hưởng của các chất cảm ứng | 71 |
| 4.3.1 Guaiacol, veratyl alcohol, CuSO_4 | 71 |
| 4.3.2 Các chất ô nhiễm khác | 72 |
| 4.4 Ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt | 74 |
| 4.5 Ảnh hưởng của nguồn carbon, nitơ và môi trường thay thế | 76 |
| 4.5.1 Ảnh hưởng của nguồn carbon | 76 |
| 4.5.2 Ảnh hưởng của nguồn nitơ | 78 |
| 4.5.3 Ảnh hưởng của môi trường thay thế | 80 |
| 5 MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA LACCASE THÔ | 81 |
| 5.1 pH tối ưu và độ bền pH | 81 |
| 5.1.1 pH tối ưu | 81 |
| 5.1.2 Độ bền pH | 83 |
| 5.2 Nhiệt độ thích hợp cho hoạt động của laccase và độ bền nhiệt | 84 |
| 5.2.1 Nhiệt độ thích hợp cho hoạt động của laccase | 84 |
| 5.2.2 Độ bền nhiệt | 85 |
| 6 PHÂN LOẠI CHỦNG NẤM SỢI FNA1 BẰNG PHƯƠNG PHÁP SO SÁNH TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN MÃ HÓA 18S rRNA | 86 |
| 6.1 Tách chiết DNA tổng số | 86 |
| 6.2 Nhân đoạn gen 18S rRNA bằng kỹ thuật PCR | 87 |
| 6.3 Tách dòng gen 18S rRNA trong vector pTZ57R/T | 88 |
| 6.4 So sánh trình tự đoạn gen mã hóa 18S rRNA của chủng FNA1 | 91 |
| KẾT LUẬN | 94 |
| KIẾN NGHỊ | 95 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 96 |
| PHỤ LỤC | 103 |

MỞ ĐẦU

DDT (Dichloro - Trichloroethane Diphenyl) là một trong những thuốc trừ sâu tổng hợp được biết đến nhiều nhất. DDT được tổng hợp đầu tiên vào năm 1874, nhưng thuộc tính thuốc trừ sâu của DDT thì cho đến 1939 mới được khám phá. Vào những năm đầu của Chiến tranh Thế giới thứ II, DDT được sử dụng với lượng lớn để kiểm soát muỗi truyền bệnh sốt rét, bệnh sốt phát ban, và các bệnh do côn trùng khác trong cả quân đội lẫn dân cư. DDT trở thành loại thuốc trừ sâu phổ biến sử dụng trong nông nghiệp. Chúng có mặt ở khắp mọi nơi, trong không khí, đất, nước do một lượng lớn đã được giải phóng ra khi phun trên các cánh đồng và rừng để diệt muỗi và côn trùng.

Ngày nay DDT đã bị cấm sử dụng do tính độc của nó như có khả năng gây ung thư tiềm tàng, gây đột biến và gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Để bảo vệ môi trường và sức khỏe con người, cần phải xử lý khử độc DDT trong môi trường đất cũng như trong các môi trường khác. DDT ở trong đất có thể giảm đi do sự bay hơi, sự xói mòn đất, sự hấp thu của động vật, thực vật và sự phân hủy sinh học của các vi sinh vật có sẵn trong đất nhưng với thời gian tương đối lâu.

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam, đã có một số phương pháp khử độc khác nhau được nghiên cứu và áp dụng. Trong đó phương pháp xử lý sinh học nhờ các vi sinh vật và hệ enzyme do chúng tiết ra là một hướng đi mới có nhiều triển vọng. Hệ enzyme sử dụng trong xử lý sinh học chủ yếu là các enzyme ngoại bào, chúng có khả năng phá vỡ các liên kết trong các hợp chất hữu cơ hoặc xúc tác chuyển hóa chúng thành các chất ít độc hơn và các dạng dễ bị phân hủy hơn. Nhóm enzyme có vai trò lớn trong quá trình phân hủy DDT cũng như các chất thuộc POPs khác gồm có laccase (Lac), mangan

peroxidase (MnP) và lignin peroxidase (LiP), trong đó laccase có vai trò quan trọng và đang bắt đầu được quan tâm nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam.

Tại Nhóm nghiên cứu Công nghệ sinh học xử lý khử độc các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy (Persistent Organic Pollutants – POPs), phòng Công nghệ Sinh học Môi trường, Viện CNSH, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã có những nghiên cứu bước đầu về khả năng phân hủy DDT, DDD, DDE và sinh enzyme ngoại bào Lac, MnP, LiP [4,5,6]. Để làm rõ bản chất sinh học và khả năng sinh enzyme của các chủng nấm sợi phân lập từ đất ô nhiễm DDT phục vụ cho các nghiên cứu ứng dụng enzyme ngoại bào vào xử lý các chất ô nhiễm khó phân hủy POPs, chúng tôi đã thực hiện đề tài với tên là: ***“Nghiên cứu phân loại, khả năng phân hủy DDT và sinh laccase của chủng nấm sợi phân lập từ đất ô nhiễm hỗn hợp thuốc trừ sâu”***.

Nội dung bao gồm:

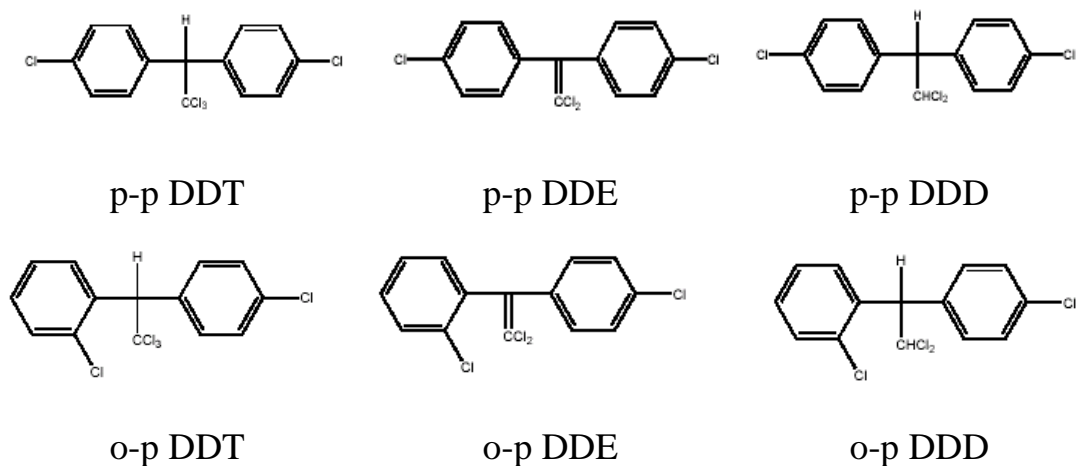
1. Phân loại và định tên chủng nấm sợi dựa vào đặc điểm hình thái và trình tự đoạn gene mã hoá 18S rRNA.
2. Nghiên cứu khả năng phân hủy DDT của chủng nấm sợi FNA1.
3. Nghiên cứu khả năng sinh laccase của chủng nấm sợi FNA1.

PHẦN I TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1 ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC VÀ TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA DDT

1.1 Cấu trúc của DDT

DDT là một trong các thuốc diệt côn trùng, chúng là một nhóm các hợp chất hữu cơ có hai vòng thơm và có chứa Clo, bao gồm 14 hợp chất hữu cơ, trong đó: 71% là p,p'- DDT, 14.9% là o,p'- DDT, 0.3% p,p'- DDD, 0.1% là o,p'-DDD, 4% là p,p'- DDE, 0.1% là o,p'-DDE, sản phẩm khác là 3.5% (Hình 1.1).



Hình 1.1. Công thức cấu tạo của một số đồng phân DDT

1.2 Tính chất lý hóa của DDT

Tất cả các đồng phân của DDT đều là dạng tinh thể màu trắng, không mùi, không vị, có công thức tổng quát là $C_{14}H_9Cl_5$, khối lượng phân tử là 354.5. Nhiệt độ nóng chảy khoảng $108.5 - 109^{\circ}C$, áp suất bay hơi là 2.53×10^{-5} Pa (1.9×10^{-7} mmHg) tại $20^{\circ}C$. DDT tan ít trong nước ($1\mu g/l$) nhưng có khả năng giữ nước, tan tốt trong các hợp chất hữu cơ đặc biệt là mỡ động vật. Khả