

**BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO**

**VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

~~~~~\*~~~~~

**CHÂU NGỌC ĐIỆP**

***Đề tài:***

**Nghiên cứu lựa chọn điều kiện thích hợp đến khả năng sinh enzyme ngoại bào manganese peroxidase (MnP), phân hủy thuốc nhuộm từ chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. FBH11**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội – 2010**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

~~~~~\*~~~~~

**CHÂU NGỌC ĐIỆP**

***Đề tài:***

**Nghiên cứu lựa chọn điều kiện thích hợp đến khả năng sinh enzyme ngoại bào manganese peroxidase (MnP), phân hủy thuốc nhuộm từ chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. FBH11**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội – 2010**

## **LỜI CẢM ƠN**

*Trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới PGS.TS. **Đặng Thị Cẩm Hà** - Nguyên Trưởng phòng Công nghệ sinh học môi trường - Viện Công nghệ sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Người đã hướng dẫn luận văn cho tôi, cô đã tận tình chỉ bảo, quan tâm, giúp đỡ và dìu dắt tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành công trình này, cung cấp nhiều kiến thức và kinh nghiệm trong nghiên cứu khoa học.*

*Trong quá trình thực hiện luận văn, tôi đã nhận được sự giúp đỡ, tận tình chỉ bảo, ủng hộ của các cán bộ, anh, chị, em tại Phòng Công nghệ Sinh học môi trường như: HVCH. Nguyễn Nguyễn Quang, TS. Nguyễn Bá Hữu, , HVCH. Đàm Thúy Hằng, KS Nguyễn Quang Huy, ThS. Đào Ngọc Ánh. Tôi cũng nhận được làm việc và thực hiện một phần của luận văn tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Quốc gia về công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học.*

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các thầy, cô giáo giảng dạy thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.*

*Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới những người thân trong gia đình và bạn bè đã ủng hộ, động viên giúp đỡ tôi cả về tinh thần và vật chất để tôi có thể hoàn thành luận văn này.*

*Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn.!*

*Hà Nội, tháng 11 năm 2010*

**Châu Ngọc Diệp**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các cộng sự khác;

Các kết quả và số liệu trình bày trong luận văn là trung thực, chưa được công bố bởi bất kì tác giả nào.

Hà Nội, ngày 20 tháng 11 năm 2010

Học viên

**Châu Ngọc Diệp**

## BẢNG CHỮ CÁI VIẾT TẮT

|                      |  |
|----------------------|--|
| 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD | 1,2,3,4,6,7,8,9-octachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin                |
| 2,3,7,8-TCDD         | 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin                       |
| 2,4,5-T              | 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid                                  |
| 2,4-D                | 2,4-dichlorophenoxyacetic acid                                     |
| 2,7-DCDD             | 2,7-dichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin                              |
| ABTS                 | axít 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic              |
| BTEX                 | Nhóm chất vòng thơm gồm benzene, toluene, ethylbenzene và xylene   |
| BOD                  | Nhu cầu oxy hóa sinh học (Biochemical Oxygen Demand)               |
| CB                   | Biphenyl chứa clo  |
| CDD                  | Dibenzo- <i>p</i> -dioxin chứa clo                                 |
| CDF                  | Dibenzofuran chứa clo  |
| CFU                  | Đơn vị tạo thành khuẩn lạc (Colony-Forming Unit)                   |
| COD                  | Nhu cầu oxy hóa học (Chemical Oxygen Demand)                       |
| DDT                  | 1,1,1-trichloro-2,2-bis ( <i>p</i> -chlorophenyl) ethane           |
| PAHs                 | Hydrocacbon thơm đa nhân   |
| PCBs                 | Polychlorobiphenyls  |
| PCDDs                | Polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxin                          |
| PCDFs                | Polychlorinated dibenzofuran                                       |
| POPs                 | Hợp chất hữu cơ khó phân hủy (Persistent Organic Pollutants)       |
| TS                   | Tổng các chất rắn (Total Solid)                                    |
| TEF                  | Hệ số độc tương đương (Toxic Equivalency Factor)                   |
| TEQ                  | Lượng độc tố tương đương (Toxic Equivalent)                        |
| TCP                  | Trichlorophenol  |
| DCP                  | Dichlorophenol   |
| LiP                  | Lignin peroxidase  |
| MnP                  | Manganese peroxidase   |
| Lac                  | Laccase  |
| HPLC                 | Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-Performance Liquid Chromatography) |
| RBBR                 | Remazol brilliant blue R   |
| NY1                  | Acid Red 299   |
| NY3                  | Acid Blue 62   |
| NY5                  | Acid Blue 281  |
| NY7                  | Acid Red 266   |
| NY8                  | Acid Orange 116  |

## DANH MỤC CÁC BẢNG

|          |   | Trang |
|----------|---|-------|
| Bảng 1.2 | Phân hủy các chất ô nhiễm bởi nấm và các enzyme của chúng               | 25    |
| Bảng 2.1 | Các loại màu được sử dụng trong nghiên cứu                              | 30    |
| Bảng 2.2 | Môi trường phân lập các chủng nấm sợi                                   | 31    |
| Bảng 2.3 | Môi trường sàng lọc chủng nấm sợi có khả năng sinh enzyme ngoại bào MnP | 32    |
| Bảng 3.1 | Hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm đã được phân lập                  | 44    |
| Bảng 3.2 | Hoạt tính MnP, LiP và laccase của 4 chủng nấm được tuyển chọn           | 47    |
| Bảng 3.3 | Hoạt tính MnP của chủng FBH11 trong lên men rắn                         | 68    |
| Bảng 3.4 | Hoạt tính enzyme MnP thô còn lại trong quá trình loại màu sau 4 ngày    | 76    |
| Bảng 3.5 | Độ bền pH của MnP từ chủng FBH11  | 78    |

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

|           |   | Trang |
|-----------|---|-------|
| Hình 1.1  | Công thức cấu tạo 2,4,5-T   | 4     |
| Hình 1.2  | Cấu trúc hóa học của PCDDs  | 5     |
| Hình 1.3  | Công thức cấu tạo 2,3,7,8-TCDD  | 6     |
| Hình 1.4  | Đặc điểm và cấu trúc hoá học một số thuốc nhuộm   | 11    |
| Hình 1.5  | Con đường phân hủy 2,7-DCDD nhờ nấm mục trắng<br><i>P. chrysosporium</i>                          | 16    |
| Hình 1.6  | Cấu trúc không gian của enzyme MnP từ chủng nấm<br><i>P. chrysosporium</i>                        | 23    |
| Hình 3.1  | Khả năng sinh enzyme ngoại bào của 4 chủng chọn lọc   | 46    |
| Hình 3.2  | Ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy khác nhau lên khả năng<br>sinh enzyme MnP của chủng FBH11   | 49    |
| Hình 3.3  | Mối quan hệ giữa sự phát triển và sinh MnP của chủng FBH11<br>trên môi trường cao malt sau 8 ngày | 50    |
| Hình 3.4  | Ảnh hưởng của pH môi trường lên sinh trưởng và phát triển của<br>chủng FBH11                      | 52    |
| Hình 3.5  | Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên sự phát triển và sinh<br>enzyme MnP của chủng FBH11      | 53    |
| Hình 3.6  | Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự phát triển của chủng nấm FBH11                                      | 54    |
| Hình 3.7  | Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh enzyme<br>MnP của chủng FBH11                            | 54    |
| Hình 3.8  | Ảnh hưởng của các chất ô nhiễm khác nhau lên sinh trưởng của<br>chủng FBH11                       | 55    |
| Hình 3.9  | Ảnh hưởng của các chất ô nhiễm khác đến khả năng sinh<br>MnP của chủng FBH11                      | 56    |
| Hình 3.10 | Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết malt lên sự phát triển của<br>chủng nấm FBH11 chủng FBH11        | 57    |
| Hình 3.11 | Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết malt lên khả năng sinh enzyme<br>MnP của chủng FBH11             | 58    |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Hình 3.12 | Ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau lên sự phát triển của chủng nấm FBH11                 | 59 |
| Hình 3.13 | Ảnh hưởng của một số nguồn nitơ lên khả năng sinh MnP của chủng FBH11                        | 59 |
| Hình 3.14 | Ảnh hưởng của nồng độ $\text{NH}_4\text{Cl}$ lên khả năng sinh enzyme MnP của chủng FBH11    | 60 |
| Hình 3.15 | Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D lên phát triển của chủng FBH11                                   | 62 |
| Hình 3.16 | Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến khả năng sinh enzyme MnP của chủng FBH11                     | 63 |
| Hình 3.17 | Ảnh hưởng của các chất cảm ứng lên khả năng sinh MnP của chủng FBH11                         | 64 |
| Hình 3.18 | Ảnh hưởng của nồng độ các chất cảm ứng được chọn lọc lên khả năng sinh MnP của chủng FBH11   | 65 |
| Hình 3.19 | Sự phát triển của chủng FBH11 trên các nguồn chất độn  | 67 |
| Hình 3.20 | Sơ đồ thiết bị lên men bioreactor dung tích 15 lít   | 69 |
| Hình 3.21 | Hoạt tính enzyme MnP của chủng FBH11 trong quá trình lên men lỏng trong bioreactor           | 70 |
| Hình 3.22 | Khả năng loại màu các loại thuốc nhuộm của chủng FBH11 sau 6 ngày                            | 71 |
| Hình 3.23 | Khả năng loại màu thuốc nhuộm của chủng FBH11 sau 6 ngày nuôi                                | 73 |
| Hình 3.24 | Hoạt tính MnP của chủng FBH11 trên môi trường nuôi cấy chứa các màu khác nhau theo thời gian | 74 |
| Hình 3.25 | Khả năng phân hủy màu thuốc nhuộm của MnP thô từ chủng FBH11                                 | 75 |
| Hình 3.26 | pH tối ưu của MnP từ chủng FBH11   | 77 |
| Hình 3.27 | Ảnh hưởng của pH đệm lên hoạt tính của MnP từ chủng FBH11                                    | 77 |
| Hình 3.29 | Ảnh hưởng của nhiệt độ ủ lên hoạt tính của enzyme MnP  | 79 |
| Hình 3.30 | Ảnh hưởng của nhiệt độ ủ lên độ bền của MnP  | 80 |



## MỤC LỤC

|   |            |
|---|------------|
| Lời cảm ơn  | <b>i</b>   |
| Lời cam đoan  | <b>ii</b>  |
| Danh mục các chữ cái viết tắt   | <b>iii</b> |
| Danh mục các bảng biểu  | <b>iv</b>  |
| Danh mục các hình vẽ, đồ thị  | <b>v</b>   |
| Lời mở đầu  | 1          |
| <b>PHẦN I TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b>  | 4          |
| I Đặc điểm cấu trúc và tính chất hoá học của chất diệt cỏ/dioxin và thuốc nhuộm             | 4          |
| I.1 Chất diệt cỏ/dioxin và thuốc nhuộm  | 4          |
| I.1.1 Chất diệt cỏ 2,4,5-T  | 4          |
| I.1.2 Chất diệt cỏ 2,4-D  | 4          |
| I.1.3 Các hợp chất dioxin chứa clo (PCDDs)  | 5          |
| I.1.4 Thuốc nhuộm và vi sinh vật phân hủy thuốc nhuộm                                       | 6          |
| I.1.5 Tổng quan về các phương pháp xử lý nước thải dột nhuộm đang được áp dụng tại Việt Nam | 12         |
| I.2 Tình trạng ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin ở Việt Nam                                       | 14         |
| I.3 Tác hại của chất diệt cỏ/ dioxin đối với môi trường và con người                        | 14         |
| I.4 Sự phân hủy chất diệt cỏ/dioxin   | 15         |
| I.4.1 Sự phân hủy chất diệt cỏ/dioxin trong môi trường                                      | 15         |
| I.4.2 Phân hủy chất diệt cỏ/dioxin và quá trình đồng trao đổi chất ở nấm                    | 15         |
| I.5 Các phương pháp tẩy độc   | 18         |
| I.5.1 Phương pháp tẩy độc bằng nhiệt  | 18         |
| I.5.2 Phương pháp quang hóa, hóa học  | 18         |
| I.5.3 Phương pháp khử độc bằng công nghệ phân hủy sinh học                                  | 19         |
| II Mangan Peroxidase  | 21         |
| 1. Khái niệm  | 21         |
| 2. Cấu trúc của MnP   | 22         |

|  |           |
|--|-----------|
| 3. Tính chất hóa sinh của MnP  | 23        |
| 4. Cơ chế hoạt động của MnP  | 24        |
| 5. Ứng dụng của MnP trong phân hủy sinh học  | 24        |
| 6. Phân bố của MnP và một số vi sinh vật sinh MnP  | 26        |
| 6.1 MnP sinh ra từ nấm đảm   | 26        |
| 6.2 MnP sinh ra từ nấm sợi   | 27        |
| 6.3 MnP sinh ra từ xạ khuẩn  | 28        |
| 6.4 MnP sinh ra từ vi khuẩn  | 28        |
| <b>PHẦN II VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>  | <b>30</b> |
| I Vật liệu   | 30        |
| I.1 Nguyên liệu  | 30        |
| I.2 Hoá chất   | 30        |
| I.3 Thiết bị và máy móc thí nghiệm   | 31        |
| II Phương pháp nghiên cứu  | 31        |
| II.1 Môi trường nuôi cấy và nồng độ các chất ô nhiễm được sử dụng                          | 31        |
| II.1.1 Các môi trường nuôi cấy   | 31        |
| II.1.2 Nồng độ các chất ô nhiễm sử dụng trong nghiên cứu                                   | 33        |
| II.2 Các phương pháp nghiên cứu  | 33        |
| II.2.1 Phân lập nấm sợi trong đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin ở sân bay Biên Hoà             | 33        |
| II.2.1.1 Phân lập bằng phương pháp pha loãng   | 33        |
| II.2.1.2 Phân lập bằng phương pháp làm giàu  | 34        |
| II.2.2 Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của các chủng nấm                               | 34        |
| II.2.3 Sàng lọc và khảo sát nấm có khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào LiP, MnP và Lac | 35        |
| II.2.4 Phương pháp xác định hoạt tính MnP, LiP và laccase của vi sinh vật                  | 35        |
| II.2.4.1 Xác định hoạt tính manganese peroxidase   | 35        |
| II.2.4.2 Xác định hoạt tính enzyme lignin peroxidase                                       | 36        |
| II.2.4.3 Xác định hoạt tính laccase  | 37        |