

KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CACBUA HYDRO CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM SỢI PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN KHU VỰC RỪNG TRỒNG CÂY TRANG (KANDELIA CANDEL DRUCE) Ở GIAO THỦY NAM ĐỊNH

Mai Thị Hằng, Phạm Thị Trang

Khoa Sinh - KTNN trường ĐHSPT Hà Nội

I. Mở đầu

Phần lớn nấm sợi là các vi sinh vật sống hoại sinh trong đất, nước và trên xác động thực vật. Với hệ enzym mạnh và đa dạng các loại nấm sợi này giữ một vai trò quan trọng trong các chu trình chuyển hóa các chất hữu cơ và vô cơ trong tự nhiên. Chúng cũng có thể tồn tại trên các cơ thể sống ở dạng cộng sinh và ký sinh. Có nhiều loài cộng sinh với thực vật (Mycorrhizal fungi) và trở thành yếu tố không thể thiếu được trong đời sống thực vật. Một đặc tính quý khác của nấm sợi là chúng có thể sinh ra các enzym phân giải các chất thải độc hại trong môi trường như dầu mỏ, các chất hóa học có cấu trúc mạch vòng (đặc biệt là các vòng benzen) trong phân tử. Việc khai thác và vận chuyển dầu khí là một trong những nguyên nhân quan trọng dẫn đến ô nhiễm dầu, đặc biệt là môi trường biển. Đã có những công trình nghiên cứu về nấm sợi và vai trò phân giải dầu của chúng song những nghiên cứu về vi nấm và khả năng phân giải cacbua hydro dầu mỏ của chúng từ môi trường rừng ngập mặn trên thế giới còn ít [3], còn ở Việt Nam hầu như chưa có nghiên cứu nào đề cập đến. Trong bài báo cáo này chúng tôi muốn trình bày một số kết quả điều tra về khả năng phân giải dầu của một số chủng nấm sợi phân lập được từ rừng ngập mặn khu vực Giao Thủy (Nam Định).

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Lấy mẫu: Lấy các mẫu từ rừng ngập mặn (RNM) trồng cây *Kandelia candel* Druce ở xã Giao Lạc huyện Giao Thủy tỉnh Nam Định (rừng trồng 4 tuổi).

Phương pháp phân lập: Sử dụng phương pháp phân lập mẫu trực tiếp và pha loãng mẫu theo các tài liệu công bố [6].

Môi trường phân lập: Môi trường cao men - thạch YEA và môi trường D [4]. Sau khi thanh trùng thêm vào các môi trường trên 1% Chloramphenicol.

Phát hiện hoạt tính enzym: Phát hiện hoạt tính xenlulaza, amylaza và kitinaza bằng các phương pháp đã mô tả trong tài liệu [2], có cải tiến.

Phát hiện khả năng phân giải dầu: Cây nấm sợi trong bình tam giác dung tích 100 ml có chứa 50 ml môi trường khoáng sau (g/l): KH_2PO_4 : 0,3; MgSO_4 : 0,4g; KNO_3 : 3g; Na_2HPO_4 : 0,7g; Nước biển 1000 ml pH: 5,5 - 6,0 và 5% dầu DO hoặc dầu thô (mỏ Bạch Hổ). Sau 15 ngày nuôi cấy tĩnh ở 25 °C, đo sinh khối khô của nấm sợi, đánh giá mức độ mất các giọt dầu và mùi dầu.

III. Kết quả và bàn luận

1. Khả năng phân giải dầu của một số chủng nấm sợi phân lập từ RNM trồng cây trang ở Giao Thủy Nam Định

Bảng 1. Đánh giá khả năng phân giải dầu của một số chủng nấm sợi

Chủng nấm phân giải dầu	Đặc điểm sinh trưởng và phát triển trên môi trường có 5% DO	Sinh khối (mg/0,1l)	Đánh giá
N16: <i>Alternaria</i>	-Có phát triển, còn mùi dầu, còn ít các giọt dầu	142	Yếu
L22. <i>Aspergillus</i>	-Có phát triển, còn mùi dầu, còn ít các giọt dầu	53	Yếu
L30. ND	-Có phát triển, còn mùi dầu, còn ít các giọt dầu	362	Yếu
L32. <i>Mucor</i>	-Có phát triển, còn mùi dầu, còn ít các giọt dầu	362	Yếu
L19. <i>Penicillium</i>	Phát triển mạnh, còn ít mùi dầu, còn ít giọt dầu	501	TB
L20. <i>Penicillium</i>	Có phát triển, có mùi dầu, hết giọt dầu	135	TB
L29. <i>Curvularia</i>	Phát triển mạnh, còn ít giọt dầu, còn ít mùi	201	TB
L26. <i>Verticillium</i>	Phát triển mạnh, còn ít giọt dầu, còn ít mùi	328	TB
L27. <i>Verticillium</i>	Phát triển mạnh, hết mùi dầu, còn ít dầu	246	Tốt
L40. <i>Curvularia</i>	Có phát triển, gần hết dầu, ít mùi dầu	229	Tốt
L28. <i>Aspergillus</i>	Phát triển mạnh, còn ít mùi dầu, hết giọt dầu	256	Tốt
L25. <i>Aspergillus</i>	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	327	Rất tốt
L35. <i>Cladosporium</i>	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	256	Rất tốt
NT16. <i>Paecilomyces</i>	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	234	Rất tốt
NT23. <i>Fusarium</i>	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	320	Rất tốt
NT33. <i>Penicillium</i>	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	135	Rất tốt
NT36. <i>Aspergillus</i>	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	630	Rất tốt
T40 ND	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	430	Rất tốt
NT14. <i>Aspergillus</i>	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	330	Rất tốt
T11 ND	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu		Rất tốt
N6. ND	Có phát triển, hết dầu, hết mùi dầu	630	Rất tốt

Ghi chú: Nuôi cấy tình các nấm sợi trên môi trường khoáng có chứa 5% dầu DO và 2,5% NaCl 15 ngày ở 25 °C. Đánh giá khả năng phân giải dầu theo các mức sau: Yếu: còn nhiều giọt dầu còn mùi dầu; Trung bình: còn mùi ít, còn ít giọt dầu; Tốt: hết giọt dầu nhưng vẫn ngửi thấy mùi dầu; Rất tốt: không thấy còn mùi dầu, giọt dầu. Sinh khối vì sinh vật nói lên khả năng sử dụng dầu như nguồn cacbon duy nhất để sinh trưởng và phát triển, không phải khi nào cũng trùng khớp với khả năng phân giải. TB: trung bình.

Từ các mẫu đất, lá, thân cây cành của cây trang lấy từ rừng trồng cây trang 4 năm ở xã Giao Lạc, Giao Thủy, Nam Định chúng tôi đã phân lập được 196 chủng nấm sợi. Sau khi nuôi cấy chúng trên môi trường khoáng chứa 5% dầu DO chúng tôi thấy có 42 chủng nấm sợi (chiếm gần 22% tổng số chủng nấm sợi) có khả năng phân giải dầu mỡ in vitro với các mức độ khác nhau. Một số chủng đại diện có hoạt tính phân giải dầu mỡ được ghi ở bảng 1.

Hầu hết các chủng phân giải dầu mỡ có mặt trong các mẫu RNM Nam Định đều thuộc về các chi nấm mốc quen thuộc đó là *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* *Paecilomyces*. Các chi này cũng là những chi thường có khả năng phân giải dầu mỡ phân lập từ các vùng ô nhiễm dầu [1,5].

Trong số 42 chủng phân giải dầu này có 10 chủng tỏ ra phân giải mạnh dầu DO (xem bảng 1), 2 trong số các chủng này đó là các chủng L19 (*penicillium* sp.) và NT 36 (*Aspergillus* sp.), có khả năng phân giải cả dầu mỡ thô lấy từ mỡ Bạch Hồ.

Khả năng phát triển của một số chủng nấm sợi trên môi trường có chứa 5% dầu DO được ghi lại ở hình 2.

Chú thích: Bình ký hiệu DC- là bình đối chứng trong đó chứa môi trường khoáng vô trùng có thành phần: KH_2PO_4 : 0,3g; $MgPO_4$: 0,4g;; KNO_3 : 3g; Na_2HPO_4 : 0,7g; nước biển: 1000ml, pH: 5,0 - 5,5) và 5% dầu DO là nguồn cacbon duy nhất. Các bình ký hiệu HT1.6, HT1.9, TH3.2, ND 1.7 là các bình thí nghiệm có nuôi cấy các chủng nấm mốc có ký hiệu tương ứng trên môi trường có thành phần như trong bình đối chứng sau 15 ngày ở 25 °C. Có thể thấy các giọt dầu trong bình đối chứng vẫn còn nguyên do không có vi nấm phân giải, còn trong các bình thí nghiệm khác vi nấm phát triển mạnh làm tan biến các giọt dầu và tạo sinh khối nấm.

2. Khả năng chịu mặn của các chủng nấm sợi phân giải dầu

Chúng tôi đã nghiên cứu khả năng chịu mặn của các chủng nấm sợi có khả năng phân giải dầu. Kết quả cho thấy các chủng này đều có khả năng phát triển tốt ở môi trường nước biển (2,5% NaCl) cũng như trên môi trường có các nồng độ muối cao hơn 5% (xem bảng 2).

Bảng 2. Khả năng chịu mặn của các chủng nấm sợi phân giải dầu m'nh

TT	Chủng	Nồng độ NaCl (%)					
		Ký hệ u	0	Nước biển	5	10	20
1	N6	+++	+++	+++	++	+	-
2	NT36	++	+++	+++	++	+	-
3	NT3	++	+++	+++	++	+	-
4	NT23	+++	+++	+++	+	-	-
5	NT16	+++	+++	+++	++	+	-
6	L25	++	+++	+++	+++	++	+
7	L26	++	+++	+++	++	+	-
8	L27	++	+++	+++	++	+	-
9	L28	++	+++	+++	++	+	-
10	L35	+++	+++	+++	++	+	-
11	L40	+++	+++	+++	++	+	-

Chú thích: Khả năng sinh trưởng của các chủng nấm sợi được xác định bằng độ lớn của khuẩn lạc trên môi trường YEA. Quy ước với $d = 0$: không mọc (-); $d = 1-5$ mm: mọc yếu (+); $d = 5 - 10$ mm: mọc trung bình (++); còn khi $d > 10 - 30$ mm: mọc tốt (+++).

Có tới 6 chủng nấm sợi phát triển trên môi trường có NaCl tốt hơn trên môi trường không có NaCl. Tất cả đều có thể phát triển tốt ở 5% NaCl, trong đó có 9 chủng có khả năng phát triển trung bình trên môi trường có 10% NaCl. Đặc biệt chủng L25 vẫn phát triển được trên môi trường có 20% NaCl và pứ 30% nó vẫn phát triển nhưng yếu ớt.

Những kết quả trên cho thấy các nấm sợi phân lập được là những vi nấm có khả năng chịu mặn. Chúng có thể là các nấm sợi có nguồn gốc từ đất liền dần thích ứng với môi trường ngập mặn và cư trú lâu dài trong hệ sinh thái này. Sự tồn tại và hoạt động được của các nấm sợi này trong rừng ngập mặn có ý nghĩa rất lớn đối với hệ sinh thái rừng ngập mặn (RNM). Chúng là những tác nhân làm sạch môi trường của RNM. Hơn nữa một số chủng với khả năng phân giải dầu mạnh sẽ là các đối tượng nghiên cứu cho công nghệ làm sạch môi trường bởi ô nhiễm dầu do khai thác, sử dụng, vận chuyển và đặc biệt là do các sự cố tràn dầu.

3. Hoạt tính enzym thủy phân ngoại bào của các chủng nấm sợi có khả năng phân giải dầu mạnh

Các enzym thủy phân ngoại bào như xenlulaza, proteaza, amylaza, kitinaza là các enzym then chốt của các quá trình phân giải các biopolime như lignoxenuloza, protein, tinh bột và kitin. Để đánh giá được vai trò của các nấm sợi này trong rừng ngập mặn chúng tôi đã tìm hiểu khả năng sinh các loại enzym thủy phân then chốt của các chủng vi nấm phân giải dầu mạnh (xem bảng 3)

Bảng 3. Một số hoạt tính enzym thủy phân ngoại bào của các chủng nấm sợi phân lập được

Hoạt tính enzym	Hoạt tính enzym (D-d, mm)									
	N6	NT3	NT16	NT23	NT36	L26	L27	L28	L35	L40
Xenulaza	1,2	2,3R	2,5R	1,7	1,2M	2,8	3,2	1,5	2,1	2,6
Proteaza	2,4	1,3M	1,8R	1,4R	1,4	2,0	2,2	2,6	2,8	2,0
Amylaza	0,0	2,1R	2,1R	2,1R	0,6	1,5	2,1	1,0	0	1,2
Kitinaza	1,0	1,7R	0,0	2,1R	1,3	1,2	2,6	1,0	0	0

Ghi chú: Các quy ước: hoạt tính enzym mạnh ($D-d \geq 2,0$ cm); hoạt tính enzym trung bình ($D-d \geq 1,0$ cm); hoạt tính enzym yếu ($D-d < 1,0$ cm). Các ký hiệu "R" các vi nấm sinh enzym rất mạnh tạo các vòng phân giải trong và rõ, còn các ký hiệu "M" là chỉ vòng phân giải chưa thật trong (sự phân giải xảy ra chưa triệt để).

Có thể thấy hầu hết các chủng phân giải dầu mạnh ở rừng ngập mặn đều là các chủng có các hoạt tính enzym thủy phân ngoại bào mạnh (trừ chủng NT36). Sự có mặt của các enzym thủy phân mạnh các chất lignoxenuloza của các vi sinh vật này cho phép chúng có thể tồn tại và phát triển tốt trong môi trường RNM nơi mà nguồn dinh dưỡng chủ yếu là các chất lignoxenuloza của sinh khối thực vật RNM. Chúng chắc chắn tham gia tích cực vào quá trình phân giải các hợp chất này trong rừng ngập mặn, là mắt xích quan trọng trong chuỗi thức ăn của RNM và tham gia khép kín chu trình sinh địa hóa của RNM.

IV. Kết luận

Từ các mẫu lấy ở rừng cây Trang (*Kandelia candel Druce*) trồng được 4 năm tại xã Giao Lạc, Giao Thủy, Nam Định, chúng tôi đã phân lập được 194 chủng nấm sợi, trong đó có 42 chủng có khả năng phân giải cacbua hydro dầu (chiếm 22% tổng số chủng nấm phân lập được). Trong số này có 10 chủng thể hiện khả năng sinh trưởng phát triển và phân giải mạnh dầu *DO invitro*. Trong số các chủng này có 2 chủng (chủng NT36: *Aspergillus* sp. và chủng L19 *Penicillium* sp.) có khả năng phát triển mạnh trên dầu mỏ thô lấy từ mỏ Bạch Hổ. Các chủng nấm sợi phân giải dầu có khả năng chịu mặn cao, phát triển tốt trong môi trường nước biển và môi trường khoáng có chứa 5 - 10% NaCl, thậm chí còn có thể phát triển được ở môi trường có 20% NaCl (Chủng L25: *Aspergillus* sp.). Chúng đều có khả năng phân giải mạnh xenuloza, tinh bột (đặc biệt là cả tinh bột sống), kitin và protein. Chúng có thể có nguồn gốc từ đất liền, sau đó dần thích nghi với môi trường ngập mặn và bán kỵ khí. Chúng là những vi sinh vật thường trú trong đất, xác thực vật trên các thực vật sống của RNM. Sự có mặt của các loại vi sinh vật này không những có ý nghĩa rất lớn trong lưới thức ăn của hệ sinh thái RNM mà còn là tác nhân tự nhiên làm sạch môi trường RNM trước sự ô nhiễm dầu đặc biệt khi có các sự cố tràn dầu. Chúng sẽ là nguồn gen có triển vọng cho nghiên cứu công nghệ bảo vệ môi trường RNM nói riêng và môi trường biển nói chung.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Quang Huy, Cù Việt Nga, Lưu Thị Bích Thủy, Đặng Thị Cẩm Hà. *Khả năng phân giải Phenantrenen của ba loài nấm sợi được phân lập tại các vùng ô nhiễm dầu*. Tạp chí Sinh học 2001, 23 (2), 27 - 32.
2. Chandramohan D. *The nitrogen cycles*. In: "Mangrove Microbiology". Eds. AD. Agate, C.V. Subramanian, V. Anuci. 1988, pp. 6 - 84.
3. Philip M. and Robert J. W. *Biodegradation of components of petroleum*. In "Biochemistry of Microbial degradation" eds. C. Radledge. Kluwer Academic publisher. 1994, 1 - 31.

4. Stephen B. Pointing. *Lignocellulolytic enzyme assays*. In "Marine Mycology - A practical Approach" (Ed. K. D. Hyde and S. B. Pointing) Fungal Diversity research Series 1., Fungal Diversity press, Hong Kong. 2000, pp. 137 - 157.
5. Lưu Thị Bích Thảo, Đinh Thúy Hằng và Đặng Cẩm Hà. *Nấm sợi sử dụng dầu thô và các sản phẩm của dầu phân lập từ các vùng ô nhiễm dầu Cát Lái và Cần Giờ*. Tạp chí Khoa học công nghệ 35 (1997) 20 - 26.
6. Uyenco. *Record and cultere collection of mangrove fungi*. In "Mangrove Microbiology". Eds. A. D. Agate, C.V. Subramanian, V. Anuci. 1988, pp. 29 - 34.

Summary

The hydrocarb on degrading ability of some strains of microfungi isolated from Giao Thuy (Nam Dinh province) Kandelia mangrove

Mai Thi Hang, Pham Thu Trang

Among the 194 strains of microfungi isolated from Giao Thuy mangrove, 42 are found to degrade petroleum oil and 10 with high petroleum degrading ability. Most are also highly resistant to salinity and can grow well in 5% NaCl media, several can even stand 10% NaCl media. Further more, these fungi can produce active extracellular enzymes, as cellulase, amylase. kitinase and protease.

Therefore, it can be suggested that they play a very important role not only in the mangrove food - web, but also in the bio- remediation of mangrove against oil pollution.