

Nghiên cứu tạo bộ chủng xạ khuẩn bản địa có khả năng phân giải lindane nhằm hướng tới tạo chế phẩm sinh học xử lý đất tồn dư thuốc trừ sâu để phục vụ sản xuất nông nghiệp an toàn

Lưu Trần Đông¹, Vũ Sơn Tùng¹, Vũ Hà Phương¹, Hoàng Quỳnh Anh¹, Trần Thị Quỳnh Trang¹, Nguyễn Thị Yến¹, Nguyễn Hồng Minh², Trần Thị Thanh Huyền³, Nguyễn Kim Nữ Thảo⁴, Phạm Thế Hải^{1,3*}

¹GREENLAB, Trung tâm nghiên cứu Khoa học sự sống (CELIFE), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa, Hà Nội, Việt Nam

³Bộ môn Vi sinh vật học và ⁴Bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 16/08/2022; Ngày chấp nhận đăng: 09/09/2022)

Tóm tắt

Lindane (γ -Hexachlorocyclohexan hay γ -HCH) là một trong những loại thuốc trừ sâu được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp sau năm 1945. Do những tác hại với sức khỏe của lindane, năm 2005, UNEP (United Nations Environment Programme - Chương trình môi trường liên hợp quốc) đã quyết định ngăn chặn sự ô nhiễm của lindane trên toàn thế giới. Tuy nhiên, với chu kỳ bán rã tương đối dài nên việc xử lý lượng lindane tồn dư trong đất nông nghiệp gặp rất nhiều khó khăn. Mục đích của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn những chủng xạ khuẩn bản địa có khả năng phân giải lindane nhằm phát triển chế phẩm sinh học có tác dụng loại phân giải lindane tồn dư trong đất nông nghiệp một cách an toàn và thân thiện với môi trường. Các phương pháp phân lập xạ khuẩn cơ bản đã được áp dụng kết hợp với một số phương pháp phân lập định hướng đánh giá khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn trên các môi trường có và không có lindane. Khả năng phân giải lindane của các chủng xạ khuẩn cũng được đánh giá dựa trên tốc độ loại ion clorua trong cơ chất. Các chủng xạ khuẩn đáng lưu ý sau đó được nghiên cứu các đặc điểm sinh học như hình thái, các đặc tính sinh lý sinh hóa, và một số hoạt tính chuyển hóa liên quan đến quá trình phân giải lindane. Kết quả thu được 9 chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải lindane phân lập từ những mẫu đất ở các nông trường tại Nghệ An có hàm lượng lindane cao. Đặc biệt, 02 chủng xạ khuẩn A119 và LD02 thuộc chi *Streptomyces* có hiệu suất phân giải lindane tốt nhất dựa trên khả năng loại ion clorua đã được nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm sinh học và được định danh.

Từ khóa: Lindane, xạ khuẩn, nông nghiệp, ô nhiễm đất, *Streptomyces*.

*Điện thoại: 0943318978

Email: phamthehai@vnu.edu.vn

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thuốc trừ sâu hay thuốc bảo vệ thực vật là chất hoặc hợp chất có khả năng ngăn chặn, tiêu diệt, xua đuổi hoặc giảm thiểu dịch hại (côn trùng, ve, giun tròn, ...). Lindane hay đồng phân γ -hexachlorocyclohexan còn được gọi là γ -HCH là một loại thuốc trừ sâu thuộc nhóm clo hữu cơ có phổ rộng, được tổng hợp sau chiến tranh thế giới thứ 2 cho đến những năm 1990 [1-2]. Theo quyết định 1946/QĐ-TTG năm 2010 của Thủ tướng Chính phủ, hàm lượng lindane tồn dư trong đất nông nghiệp ở mức rất cao, gấp hàng trăm lần quy định cho phép (1 - 3,8 mg/kg ở Bắc Giang, 5,2 mg/kg ở Lạng Sơn). Điều này ảnh hưởng trực tiếp tới sản xuất lương thực, thực phẩm dành cho người và động vật. Cây trồng, rau hay trái cây khi canh tác trên đất có hàm lượng lindane cao sẽ có mùi và vị khó chịu do ảnh hưởng của lindane [3]. Lindane có độ hòa tan thấp trong nước nhưng lại có tính thấm, chúng thấm vào trong đất, gây ô nhiễm đất và nguồn nước ngầm cũng như một phần nước mặt và nước uống. Lindane có thể tồn tại trong môi trường do tính hòa tan trong lipid cao và có tính ổn định hóa học, chu kỳ bán rã của lindane trong đất là 708 ngày và 2292 ngày trong nước [4-5]. Khi con người, động vật sử dụng nước hay thực phẩm canh tác trên đất nhiễm lindane, lindane có thể đi vào, tích lũy sinh học trong cơ thể gây ung thư, và các bệnh nội tiết do tác động của nó tới hệ thần kinh động vật [6-7], lindane có thể dẫn đến tê liệt, co giật thậm chí tử vong [8-9]. Do đó, vào năm 2005, UNEP (United Nations Environment Programme - Chương trình môi trường Liên Hợp Quốc) đã quyết định ngăn chặn sự ô nhiễm của lindane trên toàn thế giới. Ở nước ta, năm 2006, lindane đã bị cấm sử dụng theo quyết định số 31/2006/QĐ-BNN ngày 27 tháng 4 năm 2006 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

Để xử lý lindane, có thể áp dụng một số phương pháp hóa lý, trong đó phổ biến nhất là đốt [10]. Tuy nhiên, các cách làm này vẫn để lại một số ảnh hưởng độc hại với môi trường và không hiệu quả về mặt kinh tế. Trong khi đó, các giải pháp sinh học để xử lý các chất này (bioremediation) tỏ ra thân thiện với môi trường, mà cũng hứa hẹn khả năng xử lý tại chỗ (*in situ*) cũng như xử lý triệt để với chi phí hợp lý. Vì vậy, đây là các giải pháp được ưa chuộng hiện nay.

Vi sinh vật với vai trò chính trong phân hủy sinh học lindane được nghiên cứu ngày càng nhiều, do các tương tác hóa sinh đa dạng của chúng làm thay đổi hoặc phá hủy hoàn toàn cấu trúc của lindane. Đã có những nghiên cứu trước đây về các vi sinh vật có khả năng phân giải lindane như *Staphylococcus* sp. [11], *Pseudomonas* sp. [12], *Sphingomonas* sp. [13], ... Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào đối tượng vi khuẩn trong khi xạ khuẩn là nguồn sinh các enzyme rất đa dạng như hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase (LinA), haloalkane dehalogenase (LinB), và alcohol dehydrogenase (LinC) [14]. Do đó, việc sàng lọc, tìm kiếm phân lập các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải lindane là mục tiêu của nghiên cứu này. Bài báo này trình bày kết quả phân lập tạo bộ chủng xạ khuẩn có tiềm năng phân giải lindane từ 13 mẫu đất tại Nghệ An, Việt Nam. Đồng thời, các kết quả đánh giá đặc điểm sinh học và một số hoạt tính chuyển hóa liên quan đến khả năng phân hủy lindane của các chủng này cũng được báo cáo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

13 mẫu đất có nồng độ lindane cao ($> 0,1$ mg/kg) tại nhiều địa điểm khác nhau ở Nghệ An, Việt Nam, theo Quyết định 1946/QĐ-TTg do Thủ tướng Chính Phủ ban hành, được thu thập trong các túi zip bạc vô trùng bằng phương pháp lấy mẫu thường quy. Các mẫu đất được làm khô, lưu trữ ở 4°C và được sử dụng ngay để phân lập xạ khuẩn.

Linadne (γ -HCH 99.4%) được mua từ hãng Dr. Ehrenstorfer (Đức) và các hóa chất khác được mua từ các hãng uy tín như Merck (Hoa Kỳ), Xilong (Trung Quốc), ...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập định hướng xạ khuẩn từ các mẫu đất

Các chủng xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất dựa theo phương pháp của Aslvarez [15] Các mẫu đất sẽ được cân 10 g cho vào 100 mL nước muối sinh lý 0,85%, lắc với vận tốc 150 vòng/phút ở 30°C trong 30 phút. Sau đó dịch huyền phù được thu và trải trên đĩa chứa môi trường SC agar (g/L: tinh bột - 10, casein - 1, K_2HPO_4 - 0,5, Cycloheximine - 1, pH 7,0). Theo dõi liên tục trong 14 ngày, các khuẩn lạc xạ khuẩn trên đĩa phân lập được nhặt để tinh sạch bằng cách cấy ria 3 pha trên đĩa petri có chứa môi trường thạch MM (g/L: L-asparagine - 0,5; K_2HP_4 - 0,5; 0,2 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; pH 7,0, 1 mL chuẩn gốc lindane 1.000 ppm). Đĩa được giữ ở 30°C , sau 14 ngày quan sát hình thái khuẩn lạc, nhặt những chủng có hình thái khác nhau và tiếp tục được tinh sạch bằng cách cấy ria 3 pha trên đĩa YS agar (g/L: cao nấm men - 2; tinh bột tan - 10; thạch - 18; pH 7,0).

2.2.2. Phương pháp xác định khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn trên môi trường bổ sung lindane

Khả năng sinh trưởng của các chủng xạ khuẩn được khảo sát trên môi trường thạch MSM bổ sung 10 ppm lindane (MSM agarose + 10 ppm lindane), thạch MSM bổ sung 50 ppm lindane (MSM agarose + 50 ppm lindane) và thạch MSM không bổ sung lindane (MSM agarose). Thành phần môi trường thạch MSM như sau (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 ; K_2HPO_4 - 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,2; CaSO_4 - 0,08; H_2O - 1.000 mL; pH 7,0 - 7,2, bổ sung 0,01% vi lượng TE, agarose - 15. Bộ chủng xạ khuẩn đã phân lập được nuôi cấy trong môi trường YS. Sau đó, thu và rửa sinh khối bằng nước muối sinh lý. Sinh khối được hòa bằng nước muối sinh lý theo tỉ lệ 1 : 1 (v/v) để tạo dịch huyền phù. Sử dụng tấm bông đã khử trùng để cấy vạch dịch huyền phù lên đĩa chứa các môi trường MSM agarose, MSM agarose + 10 ppm lindane và MSM agarose + 50 ppm lindane. Sau 7 ngày ủ đĩa ở 30°C , tiến hành quan sát sự khác biệt về khả năng sinh trưởng của mỗi chủng ở trên 3 đĩa.

2.2.3. Phương pháp xác định trình tự 16S rDNA

Để xác định trình tự 16S rDNA, đoạn 16S rDNA được nhân lên bằng phản ứng PCR sử dụng môi 27F và 1492R theo phương pháp của Vingataramin và cộng sự [16]. Các chủng quan tâm được nuôi cấy qua đêm trên môi trường YS lỏng. Sau đó, 2 mL dịch nuôi của mỗi chủng được thu, ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 10 phút để thu cặn tế bào. Cặn tế bào được rửa 1 - 2 lần bằng dung dịch PBS (đệm phốt-phat chứa NaCl 0,9%). Cặn tế bào

sau khi rửa được thêm vào 455 μ L dung dịch EtNa (NaOH - 240 mM, Ethanol - 74%, EDTA - 2,7 mM) và lắc nhẹ. Hỗn dịch thu được tiếp theo được ly tâm ở 8.000 vòng/phút để thu lấy phần dịch. Dịch thu được được ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút để DNA được kết tủa và phần dịch nổi phía trên được loại bỏ. Thêm 100 μ L dung dịch hòa tan DNA (elution buffer do Qiagen cung cấp). Sau đó, phản ứng PCR được thực hiện bằng máy PCR Thermocycler (Hoa Kỳ) với thành phần hỗn hợp phản ứng sau: (μ L) Taq PCR master mix - 12,5, mỗi P27F - 1, mỗi P1492R - 1, DNA - 1, nước PCR - 9. PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt như sau: 96°C - 3 phút, 35 chu kỳ (95°C - 45 giây, 55°C - 45 giây, 68°C - 2 phút), 68°C - 7 phút. Đoạn 16S rDNA được giải trình tự và sử dụng để tìm loài gần gũi bằng công cụ TruebacID.

2.2.4. Khả năng sinh enzyme loại clorua của các chủng xạ khuẩn

Khả năng sinh enzyme loại clorua của các chủng xạ khuẩn được đánh giá dựa vào phương pháp của Bergmann, J. G. [17]. Các chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong môi trường MSM lỏng có nồng độ lindane 50 ppm, ở 30°C, 150 rpm. Sau 7 ngày, hút 200 μ L dịch nuôi lắc vào giếng trong đĩa 96 giếng. Bổ sung 20 μ L dung dịch $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,25 M trong acid nitric 9 M cùng với 20 μ L dung dịch bão hòa thủy ngân thiocyanate trong ethanol. Trộn đều hỗn hợp sau đó quan sát sự thay đổi màu sắc của giếng (vàng dần nếu có ion clorua tự do). Sau 10 phút, đo độ hấp thụ quang của phức Cl tạo ra ở bước sóng 460 nm bằng máy quang phổ ELISA - microplate reader Plus384 (Hoa Kỳ). Kết quả được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel trên máy tính.

2.2.5. Các phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng được tuyển chọn

Khảo sát sử dụng các nguồn carbon khác nhau: khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn được đánh giá bằng cách cấy vạch trên môi trường cơ bản có thành phần: (g/L: Bacto yeast nitrogen base w/o amino acid - 6,7; Bacto casamino acid - 0,01; K_2HPO_4 - 10 và 1% các loại carbon hydrat khác nhau, pH 7,0). Môi trường cơ bản bổ sung 1% D-glucose được dùng làm đối chứng dương và môi trường không có nguồn carbon là đối chứng âm. Mức độ sinh trưởng được đánh giá sau 5 ngày.

Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ tới mức độ sinh trưởng của xạ khuẩn: Khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn được đánh giá bằng cách cấy vạch trên môi trường YS và ủ ở các nhiệt độ khác nhau (25, 30, 37, 45°C). Mức độ sinh trưởng được đánh giá sau 5 ngày.

Xác định ảnh hưởng của nồng độ muối tới mức độ sinh trưởng: Khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn được đánh giá bằng cách cấy vạch trên môi trường YS có các nồng độ NaCl khác nhau (0, 3, 5, 7%). Mức độ sinh trưởng được đánh giá sau 5 ngày.

Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào: thạch chứa các chủng xạ khuẩn được đặt lên môi trường thạch bổ sung 1% cơ chất: tinh bột, casein hoặc CMC, ủ ở 30°C trong 5 ngày. Các đĩa thạch được nhuộm với thuốc thử Lugol 1% để kiểm tra hoạt tính amylase, thuốc thử Congo Red 0,1% để xác định hoạt tính cellulase và protease.

Xác định ảnh hưởng của nồng độ pH đến khả năng sinh trưởng: Khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn được đánh giá bằng cách cấy vạch trên môi trường YG (g/L: Cao nấm men -

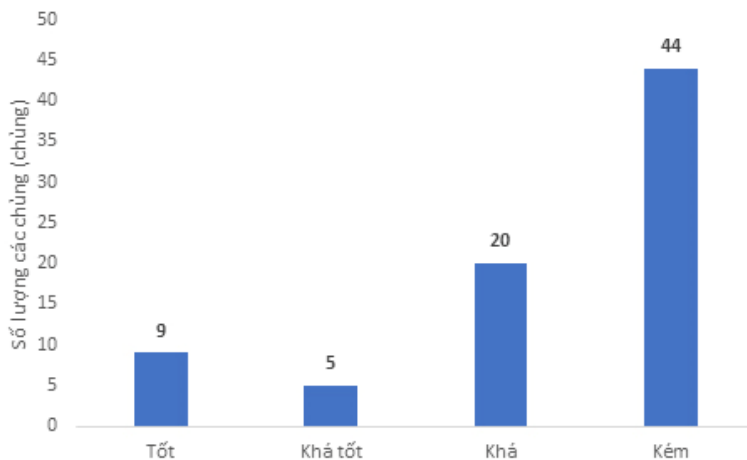
10; D-glucose - 10; agar - 20) và được chỉnh pH đến các giá trị khác nhau (5,0; 7,0; 9,0). Mức độ sinh trưởng được đánh giá sau 5 ngày.

Hình thái chuỗi bào tử của mỗi chủng xạ khuẩn được xác định bằng cách nuôi cấy xạ khuẩn trên một giọt thạch 15% trên lam kính trong 5 ngày và quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus CX23 (Nhật Bản) ở độ phóng đại 100x.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và đánh giá khả năng sinh trưởng các chủng xạ khuẩn trong môi trường có lindane

Từ 13 mẫu đất tại Nghệ An, 78 chủng xạ khuẩn đã được phân lập trên môi trường SC. Các chủng được lựa chọn dựa trên đặc điểm hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau.



Hình 1. Phân bố số lượng các chủng xạ khuẩn phân lập được theo khả năng sinh trưởng trên môi trường MSM có bổ sung lindane

Khả năng sinh trưởng của 78 chủng xạ khuẩn được đánh giá trên môi trường tối thiểu MSM rắn có bổ sung và không bổ sung lindane dựa trên việc so sánh mức độ phát triển của các chủng xạ khuẩn trên 2 môi trường trên. Kết quả (Hình 1) cho thấy, số lượng các chủng sinh trưởng tốt hơn trên môi trường có lindane (so với trên môi trường không có lindane) là 34 chủng, chiếm 44% tổng số chủng. Trong số đó, 9 chủng (12%) thể hiện khả năng sinh trưởng tốt, 5 chủng (6%) khá tốt và 20 chủng (26%) ở mức khá. Như vậy, từ kết quả trên, 9 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh trưởng trên môi trường có lindane tốt nhất được lựa chọn để tiếp tục tiến hành các thí nghiệm sau.

3.2. Hoạt tính enzyme loại chlorua liên quan đến khả năng phân giải lindane của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được

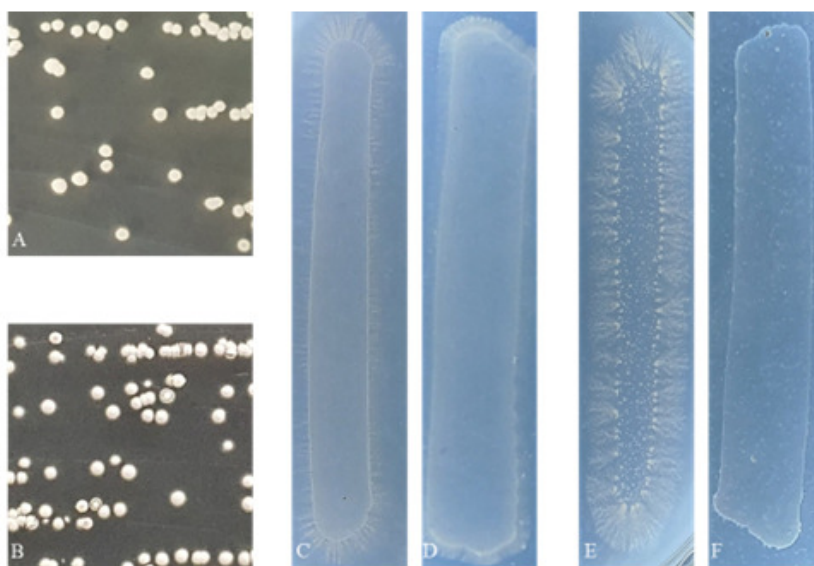
Trong thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát khả năng sinh các enzyme loại bỏ gốc halogen trong cơ chất. Quá trình khử halogen là một bước quan trọng trong quá trình phân giải hợp chất halogen. Với cơ chất lindane có chứa 6 gốc Clo trên mỗi phân tử, do đó loại Clo là một khâu tối quan trọng trong phân giải lindane [15]. Khi gốc Clo bị loại, ion clorua được giải phóng ra ngoài môi trường nuôi cấy. Do đó, bằng cách so sánh nồng độ ion clorua

giải phóng ra môi trường của 9 chủng xạ khuẩn, khả năng phân giải lindane của các chủng này có thể được đánh giá. Kết quả (Bảng 1 và Hình 2) cho thấy chỉ có 2 chủng xạ khuẩn A119 và LD02 có tốc độ loại clorua vào môi trường $\geq 0,4$ mMol/tuần; còn lại các chủng khác đều có khả năng loại clorua ở mức trong khoảng 0,2 mMol/tuần - 0,3 mMol/tuần và 2 chủng ở mức $< 0,1$ mMol/tuần. Như vậy, từ kết quả khảo sát hoạt tính enzyme, 2 chủng xạ khuẩn là A119 và LD02 đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Kết quả khảo sát tốc độ loại ion clorua của các chủng xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn	Tốc độ loại ion clorua (mMol/tuần)			Khả năng phân giải
	MSM (lindane 50ppm)	Đối chứng	Chênh lệch	
A78	0,965	0,943	0,021	+
A93	1,227	0,841	0,386	+
A118	0,933	0,902	0,030	+
A119	1,256	0,857	0,399	+
LD1	1,273	0,886	0,387	+
LD2	1,336	0,880	0,456	+
LD3	1,140	0,910	0,231	+
LD4	1,004	0,806	0,198	+
T071	0,984	0,863	0,120	+

Ghi chú: (-): không có hoạt tính; (+): có hoạt tính



Hình 2. Hình ảnh khuẩn lạc và khả năng sinh trưởng khác biệt trên môi trường chứa lindane của hai chủng xạ khuẩn đại diện

Chú thích: hình ảnh khuẩn lạc trên đĩa thạch YS của chủng A119 (A) và chủng LD02 (B); hình ảnh cấy vạch so sánh của chủng A119 trên đĩa thạch MSM có lindane (C) và trên đĩa thạch MSM không có lindane (D); hình ảnh cấy vạch so sánh của chủng LD02 trên đĩa thạch MSM có lindane (E) và trên đĩa thạch MSM không có lindane (F)

3.3. Các đặc điểm sinh học và đặc điểm phân loại của các chủng xạ khuẩn A119 và LD02 có hiệu quả phân giải tốt nhất

Đoạn gene 16S rDNA của 02 chủng xạ khuẩn A119, LD02 đã được nhân lên bằng phương pháp PCR và giải trình tự. Trình tự của cả 02 chủng đều có độ tương đồng trên 98% (Bảng 2) với các loài thuộc chi *Streptomyces* khi so sánh bằng công cụ TruebacID.

Bảng 2. Tỷ lệ tương đồng về trình tự đoạn gene 16S rDNA của 02 chủng xạ khuẩn A119, LD02 với các chủng xạ khuẩn khác trong cơ sở dữ liệu GenBank

A119		LD02	
Loài tương đồng	Tỷ lệ tương đồng	Loài tương đồng	Tỷ lệ tương đồng
<i>S. polychromogenes</i>	100%	<i>S. wuyuanensis</i>	100%
<i>S. racemochromogenes</i>	99,92%	<i>S. marianii</i>	99,85%
<i>S. yangpuensis</i>	99,75%	<i>S. tirandamycinicus</i>	99,32%
<i>S. flavotricini</i>	99,66%	<i>S. spongiicola</i>	98,71%
<i>S. amritsarensis</i>	99,66%	<i>S. lichenis</i>	98,48%
<i>S. globosus</i>	99,32%	<i>S. griseoincarnatus</i>	98,17%
<i>S. katrae</i>	99,32%	<i>S. labedae</i>	98,17%
<i>S. toxytricini</i>	99,32%	<i>S. althioticus</i>	98,17%

Từ kết quả trên, có thể khẳng định chủng A119 gần gũi nhất với loài *Streptomyces polychromogenes*. Khuẩn lạc của chủng A119 trên môi trường YS có màu trắng chuyển dần sang hồng sau 5 ngày, dạng tròn, có thùy (Hình 2A). Chủng xạ khuẩn *Streptomyces polychromogenes* đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu DNA của American Type Culture Collection (ATCC) với ký hiệu ATCC 12595 và ATCC 25484. Theo mô tả của Shirling, E.B năm 1969, chủng xạ khuẩn này có khuẩn lạc màu hồng trên nhiều môi trường khảo sát [18]. Loài *S. polychromogenes* chưa từng được nghiên cứu về khả năng phân giải lindane hay các chất hữu cơ vòng thơm, mà chỉ chứng minh có khả năng kháng nấm gây hại thực vật [19]. Kết quả nghiên cứu đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng A119 (Bảng 3) cho thấy: chủng A119 có khả năng sinh trưởng tốt trên các nguồn carbohydrat là D-galactose, D-Mannose, D-xylose; sinh trưởng kém trên D-Sorbitol, Sphrose, L-Rhamnose và Lactose. Khả năng sinh trưởng của chủng A119 ở điều kiện pH 5,0 - 9,0 là tương đối tốt và tối ưu ở pH 7,0. Về nồng độ muối, chủng A119 chịu được nồng độ muối 3%, tốt nhất ở 0% và không sinh trưởng ở nồng độ muối 5%, 7%. Chủng xạ khuẩn A119 chỉ có khả năng sinh enzyme Protease phân giải Casein. Trong nghiên cứu của Hagemann (1955), đặc điểm sinh lý sinh hóa của loài *S. polychromogenes* cũng đã được nghiên cứu. Theo đó, *S. polychromogenes* có khả năng sử dụng I-inositol, D-mannitol, L-Rhamnose hoặc Raffinose rất tốt [18]. Như vậy, chủng A119 tương đồng về hình thái khuẩn lạc với *S. polychromogenes* nhưng khả năng sử dụng các nguồn carbon hydrat không hoàn toàn tương đồng.

Chủng LD02 có độ tương đồng về trình tự 16S rRNA với loài *Streptomyces wuyuanensis* tới 100%. Chủng LD02 có khuẩn lạc trắng xám, dạng tròn có viền (Hình 2B). Loài xạ khuẩn *Streptomyces wuyuanensis* được công bố đầu tiên năm 2013 bởi Zhang và

cộng sự và thông tin được công bố bởi China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC) [20]. *S. wuyuanensis* có khuẩn lạc xám trắng trên các môi trường ISP 2-5 và chưa được nghiên cứu về khả năng phân giải các chất hữu cơ có vòng thơm. Kết quả (Bảng 3) cho thấy, chủng LD02 có khả năng sinh trưởng tốt trên các nguồn carbohydrat là D-galactose, D-Mannose, D-xylose; sinh trưởng kém trên D-sorbitol, L-sorbose, và đặc biệt không sinh trưởng trên môi trường có L-Rhamnose. Khả năng sinh trưởng của chủng LD02 ở điều kiện pH 5,0 - 9,0 là tương đối tốt và tối ưu ở pH 7,0. Về nồng độ muối, chủng LD02 chịu được nồng độ muối 3%, tốt nhất ở 0%. Ngoài ra, chủng xạ khuẩn LD02 có khả năng phân giải Cellulose, Casein. Trong báo cáo về loài *S. wuyuanensis* của Zhang, chủng *S. wuyuanensis* đại diện sinh trưởng tối ưu trong pH 6,0 đến pH 8,0 và nồng độ muối từ 0 - 9%. Đồng thời, *S. wuyuanensis* có khả năng sử dụng L-Arabinose, fructose, D-xylose, myo-inositol, D-Galactose, D-glucose, Mannitol, L-Rhamnose và sucrose. Bên cạnh đó, *S. wuyuanensis* có khả năng sinh enzyme Amylase nhưng không sinh ra Cellulase. So sánh các đặc điểm sinh lý sinh hóa của chủng LD02 với các đặc điểm của *S. wuyuanensis*, có thể thấy có sự tương đồng khá lớn về khả năng sinh trưởng, điều kiện pH và khả năng sử dụng các nguồn carbohydrat.

Bảng 3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của 2 chủng A119, LD02

Ký hiệu chủng		A119	LD02
Nguồn Carbon	Đôi chứng âm	+	+
	D-galactose	++++	++++
	D-mantose	++++	++++
	Xylose	++++	++++
	D-sorbitol	+	+
	Sepharose	+	++
	L-sorbose	+++	+
	L-Rhamnose	+	-
	D-glucose	++++	++++
	Lactose	+	++
Fructose	+++	++	
pH	5,0	+++	+++
	7,0	++++	++++
	9,0	+++	+++
Enzyme	Cellulase	-	+
	Protease	+	+
	Amylase	-	-
%NaCl	0%	++++	++++
	3%	+	+++
	5%	-	-
	7%	-	-

Ghi chú: (-) không sinh trưởng; (+) sinh trưởng rất yếu; (++) sinh trưởng yếu; (+++) sinh trưởng tốt; (++++) sinh trưởng rất tốt

3.4. Bàn luận

Các vi sinh vật phân giải thuốc trừ sâu trong tự nhiên tương đối hiếm trong môi trường đất. Việc sử dụng xạ khuẩn xử lý ô nhiễm đất nông nghiệp đã được nghiên cứu ở nhiều nơi trên thế giới. Trong mẫu đất nhiễm thuốc trừ sâu tại Argentina, Fuentes và cộng sự đã phân lập được 12 chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải thuốc trừ sâu clo hữu cơ [21]. Các vi sinh vật phân giải thuốc trừ sâu hữu cơ đã tìm ra trước đây, đa số thuộc chi *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium* và *Streptomyces*, đã được báo cáo, là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn để ứng dụng trong thực tế [22]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu xử lý lindane trong môi trường chủ yếu bằng phương pháp vật lý nhờ vật liệu nano alpha nhôm hydroxit [23] hay phương pháp hóa học nhờ nano-Fe₃O₄ [24] mà chưa có nghiên cứu sử dụng tác nhân vi sinh vật cụ thể là xạ khuẩn. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên tại Việt Nam phân lập được 9 chủng xạ khuẩn có tiềm năng phân giải lindane từ các mẫu đất nông nghiệp ô nhiễm thuốc trừ sâu. Từ đó làm cơ sở cho các nghiên cứu sản xuất chế phẩm xử lý đất nông nghiệp tồn dư lindane tại Việt Nam.

Một trong những con đường phân giải thuốc trừ sâu hữu cơ chứa gốc Clo là loại bỏ gốc halogen khỏi phân tử. Loại bỏ halogen khỏi các xenobiotics halogen hóa là một bước quan trọng trong quá trình phân hủy lindane vì các liên kết carbon-halogen tương đối bền [25]. Vì vậy xác định lượng ion clorua trong môi trường có thể đánh giá khả năng phân hủy lindane của vi sinh vật. Trong nghiên cứu của Manickam và cộng sự, thông qua hoạt tính của enzyme dehalogenase loại bỏ ion clorua trong phân tử lindane, các chủng vi khuẩn *Sphingomonas* đã được phân lập [26]. Tương tự, Benimeli và cộng sự đã báo cáo sự hiện diện của ion clorua trong môi trường nuôi cấy của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. M7 [27]. Trong nghiên cứu này, sự xuất hiện của ion clorua được đo thông qua phức hợp Fe với ion clorua trong môi trường nuôi cấy lỏng của 9 chủng xạ khuẩn. Kết quả cho thấy 4 trên 9 chủng xạ khuẩn có tiềm năng rất lớn trong khả năng phân hủy lindane giải phóng ion clorua ra môi trường. Điều này chứng tỏ các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme dehalogenase ngoại bào để khử ion clorua từ lindane. Đây là kết quả quan trọng chứng minh tiềm năng phân giải lindane của 9 chủng xạ khuẩn rất lớn cần được nghiên cứu sâu hơn.

Trong các công bố trước đây, xạ khuẩn được biết đến là nguồn sinh chất kháng sinh và các chất có hoạt tính sinh học rất đa dạng. Trong đó, chi *Streptomyces* được chú ý hơn cả do chúng đóng góp tới 70% trong số 5.000 hoạt chất sinh học được tìm thấy [27]. Kết quả định danh cho thấy cả 2 chủng có tiềm năng phân giải lindane tốt nhất đều thuộc chi *Streptomyces*. Điều này chứng tỏ tiềm năng to lớn của 2 chủng xạ khuẩn trong sản xuất chế phẩm vừa có khả năng xử lý tồn dư lindane trong đất vừa có khả năng đối kháng các mầm bệnh tự nhiên.

4. KẾT LUẬN

78 chủng xạ khuẩn tiềm năng đã được phân lập từ mẫu đất Nghệ An, Việt Nam. 9 chủng xạ khuẩn tốt nhất được lựa chọn dựa vào kết quả sàng lọc khả năng sinh trưởng trên

môi trường có lindane đạt 10% tổng số chủng để tiến hành các nghiên cứu đánh giá khả năng phân giải lindane của chúng. Như vậy, lần đầu tiên tại Việt Nam, bộ sưu tập xạ khuẩn bản địa có khả năng phân giải lindane được tạo lập. Hai chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được tuyển chọn và định danh có khả năng sinh enzyme loại bỏ ion clorua từ cơ chất mạnh. Hai chủng xạ khuẩn lựa chọn được chứng minh có khả năng sinh trưởng tốt ở các điều kiện môi trường đa dạng. Kết quả này mở ra tiềm năng thực tiễn sản xuất chế phẩm xử lý tồn dư lindane trong đất nông nghiệp, nhằm hướng tới phục vụ nông nghiệp an toàn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ trong nhiệm vụ khoa học và công nghệ Quỹ gen cấp quốc gia mã số NVQG-2021/ĐT.02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. M. Dominguez, N. Oturan, A. Romero, A. Santos, and M. A. Oturan, "Removal of lindane wastes by advanced electrochemical oxidation," *Chemosphere*, vol. 202, pp. 400-409, 2018.
- [2]. J. M. Saez, J. D. Aparicio, M. J. Amoroso, and C. S. Benimeli, "Effect of the acclimation of a *Streptomyces* consortium on lindane biodegradation by free and immobilized cells," *Process Biochemistry*, vol. 50, no. 11, pp. 1923-1933, 2015.
- [3]. J. Vijgen, B. de Borst, R. Weber, T. Stobiecki, and M. Forter, "HCH and lindane contaminated sites: European and global need for a permanent solution for a long-time neglected issue," *Environmental Pollution*, vol. 248, pp. 696-705, 2019.
- [4]. C. S. Benimeli, M. S. Fuentes, C. M. Abate, and M. J. Amoroso, "Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 61, no. 3, pp. 233-239, 2008.
- [5]. A. Beyer and M. Matthies, "Long-range transport potential of semivolatile organic chemicals in coupled air-water systems," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 8, no. 3, pp. 173-179, 2001.
- [6]. K. Nolan, J. Kamrath, and J. Levitt, "Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature," *Pediatric Dermatology*, vol. 29, no. 2, pp. 141-146, 2012.
- [7]. P. Sharma, S. Shankar, A. Agarwal, and R. Singh, "Variation in serum lipids and liver function markers in lindane exposed female wistar rats: attenuating effect of curcumin, vitamin C and vitamin E," *Asian Journal of Experimental Biological Science*, vol. 1, no. 2, pp. 440-444, 2010.
- [8]. A. Agrahari, A. Singh, A. Srivastava, R. R. Jha, D. K. Patel, S. Yadav, V. Srivastava, and D. Parmar, "Overexpression of cerebral cytochrome P450s in prenatally exposed offspring modify the toxicity of lindane in rechallenged offspring," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 371, pp. 20-37, 2019.
- [9]. D. Mladenović, D. Djuric, N. Petronijević, T. Radosavljević, N. Radonjić, D. Matić, D. Hrnčić, A. Rašić-Marković, D. Vučević, and D. Dekanski, "The correlation

- between lipid peroxidation in different brain regions and the severity of lindane-induced seizures in rats," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 333, no. 1, pp. 243-250, 2010.
- [10]. D. Kumar and R. Pannu, "Perspectives of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) biodegradation from the environment: a review," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 5, no. 1, pp. 1-18, 2018.
- [11]. D. Kumar, A. Kumar, and J. Sharma, "Degradation study of lindane by novel strains *Kocuria* sp. DAB-1Y and *Staphylococcus* sp. DAB-1W," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 3, no. 1, pp. 1-16, 2016.
- [12]. M. Kumar, S. K. Gupta, S. K. Garg, and A. Kumar, "Biodegradation of hexachlorocyclohexane-isomers in contaminated soils," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 38, no. 8, pp. 2318-2327, 2006.
- [13]. N. Manickam, M. K. Reddy, H. S. Saini, and R. Shanker, "Isolation of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* sp. by dehalogenase assay and characterization of genes involved in γ -HCH degradation," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 104, no. 4, pp. 952-960, 2008.
- [14]. S. A. Cuozzo, P. E. Sineli, J. Davila Costa, and G. Tortella, "Streptomyces sp. is a powerful biotechnological tool for the biodegradation of HCH isomers: biochemical and molecular basis," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 38, no. 5, pp. 719-728, 2018.
- [15]. A. Alvarez, C. S. Benimeli, J. M. Sáez, A. Giuliano, and M. J. Amoroso, "Lindane removal using *Streptomyces* strains and maize plants: a biological system for reducing pesticides in soils," *Plant and Soil*, vol. 395, no. 1, pp. 401-413, 2015.
- [16]. L. Vingataramin and E. H. Frost, "A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast," *Biotechniques*, vol. 58, no. 3, pp. 120-125, 2015. [17]. D. Kumar and R. Pannu, "Perspectives of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) biodegradation from the environment: a review," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 5, no. 1, pp. 1-18, 2018.
- [17]. J. G. Bergmann and J. Sanik, "Determination of trace amounts of chlorine in naphtha," *Analytical Chemistry*, vol. 29, no. 2, pp. 241-243, 1957.
- [18]. E. B. Shirling and D. Gottlieb, "Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 19, no. 4, pp. 391-512, 1969.
- [19]. A. A. Alblooshi, G. P. Purayil, E. E. Saeed, G. A. Ramadan, S. Tariq, A. S. Altaee, K. A. El-Tarabily, and S. F. AbuQamar, "Biocontrol potential of endophytic actinobacteria against *Fusarium solani*, the causal agent of sudden decline syndrome on date palm in the UAE," *Journal of Fungi*, vol. 8, no. 1, p. 8, 2021.
- [20]. X. Zhang, J. Zhang, J. Zheng, D. Xin, Y. Xin, and H. Pang, "*Streptomyces wuyuanensis* sp. nov., an actinomycete from soil," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 63, no. Pt_8, pp. 2945-2950, 2013.

- [21]. M. S. Fuentes, C. S. Benimeli, S. A. Cuzzo, and M. J. Amoroso, "Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 64, no. 6, pp. 434-441, 2010.
- [22]. A. D. Schrijver and R. D. Mot, "Degradation of pesticides by actinomycetes," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 25, no. 2, pp. 85-119, 1999.
- [23]. T. H. Nguyen, T. T. L. Nguyen, T. D. Pham, and T. S. Le, "Removal of lindane from aqueous solution using aluminum hydroxide nanoparticles with surface modification by anionic surfactant," *Polymers*, vol. 12, no. 4, p. 960, 2020.
- [24]. T. D. Tran, N. T. Dao, R. Sasaki, M. B. Tu, G. H. M. Dang, H. G. Nguyen, H. M. Dang, C. H. Vo, Y. Inigaki, and N. Van Nguyen, "Accelerated remediation of organochlorine pesticide-contaminated soils with phyto-Fenton approach: a field study," *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 42, no. 11, pp. 3597-3608, 2020.
- [25]. S. Fetzner and F. Lingens, "Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications," *Microbiological Reviews*, vol. 58, no. 4, pp. 641-685, 1994.
- [26]. C. S. Benimeli, G. R. Castro, A. P. Chaile, and M. J. Amoroso, "Lindane removal induction by *Streptomyces* sp. M7," *Journal of Basic Microbiology*, vol. 46, no. 5, pp. 348-357, 2006.
- [27]. J. Berdy, "Bioactive microbial metabolites," *The Journal of Antibiotics*, vol. 58, no. 1, pp. 1-26, 2005.

Collection of endemic actinomycetes capable of degrading lindane in order to produce biological products for the treatment of pesticide pollution toward safe agricultural production

Luu Tran Dong¹, Vu Son Tung¹, Vu Ha Phuong¹, Hoang Quynh Anh¹,
Tran Thi Quynh Trang¹, Nguyen Thi Yen¹, Nguyen Hong Minh²,
Tran Thi Thanh Huyen³, Nguyen Kim Nu Thao⁴, Pham The Hai^{1,3*}

¹GREENLAB, Center for Life Science Research (CELIFE), University of Science,
Vietnam National University, Ha Noi, Viet Nam

²Bioresource Research Center, Phenikaa University, Ha Noi, Viet Nam

³Department of Microbiology and ⁴Department of Cell Biology, Faculty of Biology,
University of Science, Vietnam National University, Ha Noi, Viet Nam

Abstract

Pesticide residues in the soil are a huge threat to agriculture. γ -hexachlorocyclohexan (lindane or isomer γ -HCH) is one of the pesticides widely used in agriculture after 1945. Due to the harmful effects on health of lindane, UNEP (United Nations Environment) Program - United Nations Environment Program) decided to stop the pollution of lindane worldwide in 2005. However, with a long half-life, it is very difficult to control residual lindane in soils. The purpose of this study is to isolate and select actinomycete strains capable of degrading lindane in order to develop a biological product that can remove residual lindane in agricultural soil in a safe and environmental-friendly manner. Basic actinomycete isolation methods have been applied in combination with a number of oriented isolation methods to evaluate the growth ability of actinomycetes on media with and without lindane. The ability to degrade lindane of actinomycetes was also evaluated based on the rate of chloride ion removal in the substrate. The remarkable actinomycetes were then studied for biological characteristics such as morphology, biochemical and physiological properties, and some metabolic activities related to the degradation of lindane. We obtained 9 actinomycetes capable of decomposing lindane isolated from soil samples in farms in Nghe An. Among them, the two strains A119 and LD02 belonging to the genus *Streptomyces* displayed the best lindane degradation performance based on their chloride ion removals. They were further studied for their biological characteristics and eventually identified.

Keywords: Lindane, actinomycetes, agriculture, soil pollution, *Streptomyces*