

KHẢ NĂNG KHÁNG VÀ HẤP THỤ KIM LOẠI NẶNG CỦA CHŨNG NẤM MỐC PHÂN LẬP TỪ LÀNG NGHỀ TÁI CHẾ KIM LOẠI

Nguyễn Như Ngọc¹, Đinh Thị Ngọc Lan¹, Nguyễn Thị Mai Lương¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Từ mẫu đất, nước thu tại 3 làng nghề tái chế kim loại: Đa Hội - Bắc Ninh; Đại Bái - Bắc Ninh; Đồng Mai - Hưng Yên, 10 chủng nấm có khả năng hấp thụ 100 mg/L Cu và Pb được phân lập. Trong đó, chủng N₁₀ phát triển tốt trên môi trường thạch chứa 1500 mg/L Cu và Pb. Các phân tích về đặc điểm hình thái và giải trình tự đoạn gen 28S rRNA cho thấy chủng N₁₀ thuộc loài *Penicillium janthinellum*, độ tương đồng 100%. Kết quả về khả năng hấp thụ các kim loại nặng Đồng (Cu), Chì (Pb), Nhôm (Al); Sắt (Fe); Kẽm (Zn) và Cadmium (Cd) của chủng *Penicillium janthinellum* được xác định trong môi trường chứa từ 500 đến 2000 mg/L muối của các kim loại nặng tương ứng. Hiệu suất hấp thụ đối với các kim loại nặng của chủng được xác định: ở nồng độ kim loại 2000 mg/L, hiệu suất hấp thụ đạt 66% với Cu; 82,23% với Pb; 75,4% với Fe; 73,66% với Zn; 82,08% với Al và 16,87% với Cd. Kết quả chụp SEM xác định vị trí kim loại hấp thụ vào sinh khối chủng N₁₀ cho thấy các hạt khoáng kim loại được phân bố trên bề mặt hoặc bên trong hệ sợi, bề mặt hệ sợi nấm có sự biến đổi, sần sùi hoặc có nhiều vết rạn, xuất hiện khá nhiều cấu trúc như các kẽ nhỏ và tại đó tập trung các hạt khoáng. Với khả năng kháng và hấp thụ các kim loại nặng tốt, chủng *Penicillium janthinellum* có thể là tác nhân tiềm năng trong việc phát triển các giải pháp sinh học xử lý môi trường ô nhiễm kim loại nặng.

Từ khóa: Kháng, hấp thụ, ô nhiễm, phân lập, *Penicillium janthinellum*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ô nhiễm kim loại nặng trong đất, nước đang là vấn đề môi trường hết sức nghiêm trọng ở trên thế giới và Việt Nam, thu hút sự quan tâm lớn của các nhà khoa học. Đặc biệt là môi trường ở các làng nghề sản xuất và tái chế kim loại ở Việt Nam đang là vấn đề nổi cộm.

Trong thời gian trước đây, việc quản lý ô nhiễm kim loại nặng trong đất phụ thuộc vào hai quá trình: Phương pháp phục hồi hóa học và phương pháp hóa học truyền thống thường chủ yếu dựa trên các phản ứng hóa học giữa kim loại nặng và hóa chất hoặc tạo phức và phản ứng ô xi hóa khử... để loại bỏ kim loại nặng (Race, M, 2017). Tuy nhiên, các phương pháp hóa học này thường tốn kém, phức tạp và gây ô nhiễm thứ cấp cũng như làm thay đổi đáng kể cấu trúc đất... Trong những năm gần đây, phương pháp phục hồi sinh thái đã được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi hơn do có chi phí thấp hơn và mang lại nhiều lợi ích về mặt sinh thái, xã hội và kinh tế. Phục hồi sinh thái là việc sử dụng quá trình siêu tích lũy của thực vật hoặc vi sinh vật để hấp thụ kim loại nặng từ môi trường bị ô nhiễm (Marques, A.P.G.C., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L (2009). Trên thực tế, việc sử dụng vi sinh vật để xử lý sinh

học kim loại nặng đã và đang nhận được sự quan tâm lớn trong việc định hướng ứng dụng để xử lý ô nhiễm kim loại nặng trong thời gian gần đây do có nhiều ưu điểm, bao gồm cả việc giữ lại cấu trúc đất, không gây ô nhiễm thứ cấp, cả chất ô nhiễm và vi sinh vật đều được hoàn toàn loại khỏi môi trường sau xử lý. Phương pháp này đang là hướng đi mới có tiềm năng ứng dụng lớn và hiệu quả.

Hai cơ chế chính để vi sinh vật tích lũy kim loại nặng là quá trình hấp phụ và hấp thụ. Quá trình hấp phụ có liên quan đến các hiện tượng bề mặt thì quá trình hấp thụ liên quan đến toàn bộ tổng thể vật liệu. Các cơ chế của sự hấp phụ bao gồm: kết tủa, hấp phụ hóa học và trao đổi ion, kết tủa bề mặt, hình thành phức ổn định với phối tử hữu cơ và ô xi hóa khử... Hấp thụ liên quan đến sự phức tạp của các kim loại nặng trên bề mặt tế bào, từ đó chúng có thể được hấp thụ vào tế bào (Danis, U., Nuhoglu, A., Demirbas (2008). Do cấu trúc bề mặt tế bào, chủ yếu là thành tế bào và lớp chất nhầy, kim loại nặng có thể được hấp phụ và hấp thụ tương đối dễ dàng. Nhiều ion trong các nhóm chức bề mặt tế bào, như nitơ, oxy, lưu huỳnh và photpho (Brady, D., Duncan, J.R (1994), có thể được tạo phức với các ion kim loại làm

nguyên tử phối hợp. Ngoài ra, các anion axit photphoric và các nhóm anion carboxyl trên bề mặt thành tế bào vi khuẩn được tích điện âm và hầu hết các bề mặt kim loại nặng mang một nhóm cation tương tác với thành tế bào và cho phép các ion kim loại liên kết hoặc đi qua màng tế bào... Tuy nhiên, theo các nhà khoa học trên thế giới, hiện nay vẫn chưa có sự phân biệt rõ ràng trong hai cơ chế này, cho dù là cơ chế nào thì kim loại nặng cũng được tế bào chuyển hóa để loại khỏi môi trường.

Đối với các nhà khoa học trong nước, những năm gần đây cũng rất chú trọng đến việc nghiên cứu phát triển phương pháp xử lý ô nhiễm kim loại nặng bằng biện pháp sinh học, việc nghiên cứu về các chủng vi sinh vật xử lý kim loại nặng cũng đang được quan tâm tập trung vào việc phân lập và xác định khả năng phát triển trong môi trường chứa kim loại nặng, tuy nhiên, các chủng vi sinh vật có khả năng kháng và hấp thụ kim loại nặng ở nồng độ cao vẫn còn hạn chế. Do đó, để bắt kịp với xu thế ứng dụng biện pháp sinh học để kiểm soát và xử lý ô nhiễm gây ra bởi kim loại nặng, việc tuyển chọn được những chủng vi sinh vật có năng lực cao hấp thụ các kim loại nặng là có ý nghĩa về mặt thực tiễn và khoa học nhằm mở ra hướng ứng dụng hiệu quả trong xử lý môi trường ô nhiễm kim loại nặng bằng biện pháp sinh học.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu nghiên cứu là mẫu đất và nước được thu thập tại 3 làng nghề sản xuất và tái chế kim loại: Đa Hội - Bắc Ninh; Đại Bái - Bắc Ninh và làng nghề tái chế chì Đồng Mai - Hưng Yên. Các mẫu nước được lấy vào các bình tam giác vô trùng với các thông số được ghi lại: ngày lấy mẫu, người lấy mẫu và địa điểm lấy mẫu, theo TCVN: 6663-3:2013. Các mẫu đất được lấy dưới lớp đất mặt, có độ sâu từ 10 - 15 cm, các mẫu được chứa trong túi nilon sạch, có ghi các thông số ngày lấy mẫu, địa điểm và người lấy mẫu theo TCVN 7538-2:2005. Mẫu được bảo quản trong 4°C để sử dụng cho nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập chủng vi sinh vật phát triển trong môi trường chứa kim loại nặng

Môi trường phân lập: Sử dụng môi trường Hansen với thành phần: glucose: 50g/L, pepton: 10g/L, KH₂PO₄: 3g/L, MgSO₄. 7H₂O: 2g/L, nước: 1000ml, thạch: 18g/L; pH = 5,5. Môi trường được khử trùng ở 120°C trong 20 phút, sau đó bổ sung muối của các kim loại nặng CuSO₄; PbSO₄ ở nồng độ 100 ppm (100 mg/L), qua màng lọc khuẩn kích thước 0,2 µm.

Nguyên tắc phân lập: Tách rời các tế bào vi sinh vật, nuôi cấy các tế bào trên môi trường dinh dưỡng cơ bản để tạo được các khuẩn lạc riêng rẽ, cách biệt nhau.

Cụ thể, các mẫu đất và nước dùng trong nghiên cứu được xác định khối lượng chính xác và thực hiện pha loãng theo dãy nồng độ tới hạn, sau đó được cấy trải trên môi trường phân lập, nuôi trong tủ ở nhiệt độ 30°C trong 3 - 5 ngày. Sau thời gian nuôi cấy, các khuẩn lạc mọc riêng rẽ trên môi trường được tách rời và làm thuần sang đĩa môi trường khác đồng thời sử dụng cho nghiên cứu các cứu sau (Nguyễn Lâm Dũng, 2010).

2.2.2. Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng hấp thụ kim loại nặng ở nồng độ cao

a. Tuyển chọn trên môi trường đặc

Các chủng nấm phân lập được trong môi trường chứa 100 ppm muối các kim loại nặng, sau khi làm thuần tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng rắn, bổ sung lần lượt: 500; 700; 1000 và 1500 ppm các muối kim loại nặng CuSO₄; PbSO₄, nuôi ở nhiệt độ 30°C trong 5 ngày. Quan sát sự phát triển của chủng trong môi trường và tuyển chọn ra các chủng phát triển tốt (Y. Benmalek, 2016).

b. Tuyển chọn trên môi trường lỏng

Các chủng phát triển tốt trong môi trường đặc được cấy chuyển sang môi trường Hansen dịch thể sau 3 ngày dùng làm giống. Dịch giống được cấp vào trong các bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường đã bổ sung các muối kim loại nặng CuSO₄; PbSO₄ ở nồng độ từ 500; 700; 1000; 1500 ppm, mật độ cấp giống với các chủng là như nhau ở 5ml/100 ml

môi trường (5% v/v), nuôi lắ ở tốc độ 150 vòng/phút, nhiệt độ 30°C trong 5 ngày. Sau thời gian nuôi cấy, quan sát sự phát triển của các chủng trong môi trường và tiến hành lọc thu và xác định lượng sinh khối ướt của các chủng. Sinh khối ướt sau đó sấy khô ở 120°C đến khối lượng không đổi để xác định lượng sinh khối khô. Dịch canh trường sau khi lọc sinh khối được dùng để xác định nồng độ kim

loại còn lại nhằm đánh giá hiệu suất hấp thụ kim loại nặng của chủng theo các phương pháp được mô tả bởi Y. Benmalek và cộng sự (Y. Benmalek, 2016). Nồng độ kim loại còn lại trong canh trường được xác định bằng phương pháp phân tích quang phổ phát xạ trên máy ICP - OES.

Hiệu suất hấp thụ kim loại của chủng tuyển chọn được xác định như sau:

$$\text{Hiệu suất hấp thụ} = \frac{\text{Nồng độ kim loại ban đầu} - \text{Nồng độ kim loại còn lại sau nuôi cấy}}{\text{Nồng độ kim loại ban đầu}} * 100\%$$

2.2.3. Đánh giá khả năng hấp thụ đối với các loại kim loại nặng khác nhau của chủng tuyển chọn

Để đánh giá khả năng kháng và hấp thụ với các kim loại nặng khác, chủng tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường Hansen dịch thể có bổ sung muối các kim loại nặng PbSO₄; CuSO₄; CdCl₂; ZnSO₄; Fe₂(SO₄)₃; AlCl₃ với nồng độ thay đổi từ 500; 700; 1000; 1500 và 2000 mg/L. Sau đó xác định sự phát triển của chủng thông qua đánh giá lượng sinh khối thu được và xác định khả năng hấp thụ thông qua hiệu suất hấp thụ kim loại trong môi trường nuôi cấy (Y. Benmalek, 2016)

2.2.4. Xác định vị trí kim loại được hấp thụ trong sinh khối của chủng tuyển chọn

Để xác định vị trí kim loại đã được hấp thụ lên sinh khối chủng vi sinh vật tuyển chọn, tiến hành chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử quét SEM (Goldstein J, 2003). Chủng tuyển chọn được nuôi lắ trong môi trường dịch thể chứa các nồng độ kim loại khác nhau và đối chứng là mẫu nuôi cấy trong môi trường không chứa kim loại, trên máy lắ ổn nhiệt tại 30°C, 150 vòng/phút. Sau khi nuôi thu được sinh khối của chủng, sấy khô và được tiến hành chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử quét.

2.2.5. Định danh chủng vi sinh vật được tuyển chọn

Dựa vào đặc điểm hình thái: khuẩn lạc, hệ sợi, bào tử nấm theo khóa phân loại nấm mốc Việt Nam như mô tả của tác giả Đặng Vũ Hồng Miên (Đặng Vũ Hồng Miên, 2015).

Chủng tuyển chọn được định tên bằng kỹ

thuật sinh học phân tử thông qua giải trình tự đoạn gen 28S rRNA sau đó phân tích kết quả bằng phần mềm phân tích trình tự NCBI, và so với kết quả trên ngân hàng Gen.

2.2.6. Thu thập và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần và với số thí nghiệm đủ lớn, các kết quả thu thập được đều được xử lý thống kê.

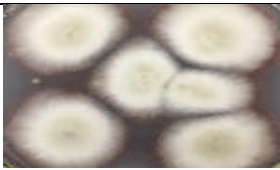



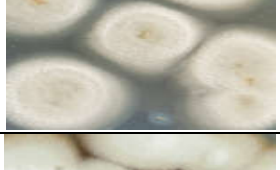




3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập chủng vi sinh vật phát triển trong môi trường chứa kim loại nặng

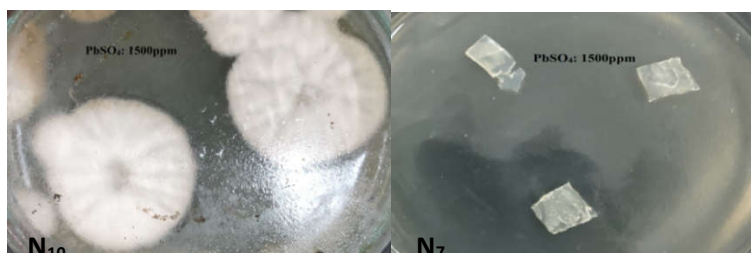
Có nhiều công bố của các tác giả cho thấy, để phân lập thành công các chủng vi sinh vật có khả năng kháng lại các kim loại nặng, các tác giả đều thu thập các mẫu ở vùng ô nhiễm kim loại nặng như các vùng đất khai thác mỏ kim loại, các trạm xăng dầu hoặc nguồn nước thải ô nhiễm... (M Iqbal Hossain, 2012; N.M. Khalil, 2016; Lucille C. Villegas, 2018). Trong nghiên cứu này, vật liệu nghiên cứu được chọn là các mẫu đất và nước thu thập từ các làng nghề sản xuất và tái chế kim loại. Theo đánh giá mức độ độc hại và mức độ kim hãm của các kim loại nặng với sự phát triển của vi sinh vật thì hai kim loại nặng là Cu và Pb là những kim loại nặng có ảnh hưởng lớn tới sự phát triển của vi sinh vật cũng như sự độc hại với môi trường. Do đó, ngay từ ban đầu, nghiên cứu này tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phát triển trong môi trường chứa hai kim loại này. Từ các mẫu đất và nước, 10 chủng nấm mốc, ký hiệu N₁ đến N₁₀ có khả năng phát triển tốt trong môi trường chứa 100 ppm muối của hai kim loại nặng Cu

và Pb đã được phân lập. Đặc điểm về khuẩn vật được thể hiện trong bảng 1. lạc, hình thái, màu sắc của các chủng vi sinh

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm phân lập được

TT	Ký hiệu chủng	Mẫu - địa điểm	Đặc điểm khuẩn lạc	Hình ảnh chủng nấm mốc phân lập
1	N ₁	Nước - Đa Hội	Bông xốp, viền tròn đều, màu trắng, Sợi khí sinh: màu trắng, sợi cơ chất màu trắng bông	
2	N ₂	Nước - Đại Bái	Bông xốp, viền rìa màu trắng, tâm xanh nhạt, bám chắc thạch, sợi khí sinh: màu trắng, sợi cơ chất màu xanh nhạt	
3	N ₃	Nước - Đồng Mai	Hệ sợi bông xốp, sợi khí sinh gồm 2 lớp: nhân tròn trắng, bìa ngoài vàng, sợi cơ chất: màu vàng	
4	N ₄	Nước - Đại Bái	Bông xốp, sợi khí sinh gồm 2 lớp: nhân tròn trắng, bìa ngoài hồng xen lẫn vàng, sợi cơ chất: màu vàng	
5	N ₅	Đất - Đồng Mai	Hạt, bông xốp, sợi khí sinh gồm 2 lớp: nhân tròn xanh xen lẫn đen, bìa ngoài trắng, sợi cơ chất: màu trắng	
6	N ₆	Đất - Đồng Mai	Bông xốp, sợi khí sinh gồm hai lớp hình thành vòng tròn đồng tâm, màu nâu nhạt, sợi cơ chất nâu	
7	N ₇	Đất - Đồng Mai	Bông xốp, sợi khí sinh màu trắng đục hình thành nhiều lớp, tâm nổi cục, sợi cơ chất màu xanh rêu	
8	N ₈	Đất - Đa Hội	Bông xốp, khuẩn lạc nhỏ, sợi khí sinh viền màu trắng, trong màu xanh dương, sợi cơ chất màu nâu	
9	N ₉	Đất - Đa Hội	Khuẩn lạc nhỏ, sợi khí sinh màu trắng xen lẫn nâu tím, sợi cơ chất màu đen	
10	N ₁₀	Đất - Đại Bái	Khuẩn lạc lớn, hình thành nhiều khía trên bề mặt, sợi khí sinh màu nâu nhạt, sợi cơ chất màu đen	

Có thể thấy các chủng nấm phân lập được đều có khả năng phát triển tốt trong môi trường chứa kim loại nặng ở nồng độ 100 mg/L, điều này khẳng định bước đầu các chủng này đều có khả năng phát triển khi có tác động của các kim loại nặng này. Có thể do được phân lập từ các mẫu nhiễm kim loại nặng nên các chủng đều đã có sự thay đổi để thích nghi với sự có mặt của các kim loại nặng trong môi trường nuôi cấy.



Hình 1. Sự phát triển của chủng N_{10} và N_7 trên môi trường chứa 1500 mg/L $PbSO_4$

Kết quả cho thấy, sau 5 ngày nuôi cấy ở cùng điều kiện, khi tăng nồng độ muối kim loại nặng đến 1500 mg/L, chỉ còn 1 chủng nấm N_{10} có thể phát triển tốt, hệ sợi ăn lan nhanh trong môi trường, trong khi chủng N_7 không phát triển được trong môi trường (Hình 1).

3.2.2. Tuyển chọn trên môi trường lỏng

Để khẳng định khả năng hấp thụ với hai kim loại này, chủng N_{10} tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng lỏng chứa nồng độ 1500 mg/L muối của hai kim loại nặng, nuôi trong các bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường dinh dưỡng bổ sung muối kim

3.2. Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng hấp thụ kim loại nặng ở nồng độ cao

3.2.1. Tuyển chọn trên môi trường đặc

Từ 10 chủng nấm phân lập có khả năng phát triển tốt trong môi trường chứa 100 mg/L muối các kim loại nặng $CuSO_4$ và $PbSO_4$, các chủng nấm tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường đặc chứa lần lượt 500; 700; 1000 và 1500 mg/L hai muối kim loại này và theo dõi trong thời gian 5 ngày.

loại nặng ở tốc độ lắ 150 vòng/phút, nhiệt độ 30°C trong 5 ngày với chủng nấm N_{10} . Song song với các bình thí nghiệm, chủng N_7 cũng được nuôi cấy để làm đối chứng cho so sánh sự phát triển và khả năng hấp thụ kim loại nặng của chúng.

Sau thời gian nuôi cấy 5 ngày, quan sát sự phát triển của các chủng trong môi trường và tiến hành lọc thu sinh khối, xác định khối lượng sinh khối ướt. Sinh khối ướt được sấy khô ở 120°C đến khối lượng không đổi để xác định lượng sinh khối khô. Kết quả được thể hiện trong bảng 2; 3 và hình 2; 3.

Bảng 2. Khối lượng sinh khối của chủng N_{10} và N_7 trong môi trường chứa $CuSO_4$

Chủng	Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ $CuSO_4$ (mg/L)				
		0	500	700	1000	1500
N_{10}	Khối lượng sinh khối ướt (g/L)	157,47 ± 0,98	149,78 ± 1,05	141,63 ± 0,79	135,44 ± 0,83	128,25 ± 0,68
N_{10}	Khối lượng sinh khối khô (g/L)	15,98 ± 0,45	15,34 ± 0,51	13,22 ± 0,37	12,48 ± 0,48	10,97 ± 0,39
N_7	Khối lượng sinh khối ướt (g/L)	129,61 ± 1,02	79,57 ± 0,82	21,43 ± 0,21	-	-

Bảng 3. Khối lượng sinh khối của chủng N_{10} và N_7 trong môi trường chứa $PbSO_4$

Chủng	Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ $PbSO_4$ (mg/L)				
		0	500	700	1000	1500
N_{10}	Khối lượng sinh khối ướt (g/L)	158,32 ± 1,05	142,44 ± 0,87	135,87 ± 0,69	124,87 ± 0,58	117,11 ± 0,91
N_{10}	Khối lượng sinh khối khô (g/L)	15,86 ± 0,24	12,84 ± 0,37	11,75 ± 0,21	10,42 ± 0,42	9,32 ± 0,37
N_7	Khối lượng sinh khối ướt (g/L)	127,43 ± 0,82	69,42 ± 0,79	17,33 ± 0,75	-	-

(-): Không xác định được



Hình 2. Hình ảnh chủng nấm N_{10} và N_7 phát triển trong môi trường chứa $CuSO_4$ (A: N_7 ; B: N_{10}) và $PbSO_4$ (A: N_4 ; B: N_{10}) ở nồng độ 1500 mg/L

Kết quả thể hiện trong bảng 2; bảng 3 và hình 2 cho thấy rằng: khi nồng độ muối hai kim loại nặng của Cu và Pb thay đổi tăng dần lên trong môi trường nuôi cấy thì sự phát triển của chủng nấm N_{10} cũng thay đổi theo so với môi trường đối chứng không bổ sung kim loại. Tuy nhiên, sự thay đổi tốc độ phát triển là không nhiều, điều này có thể cho thấy, mặc dù kim loại nặng trong môi trường có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chủng N_{10} nhưng do có khả năng kháng lại nên chủng này vẫn phát triển tốt. Khi so sánh với sự phát triển của chủng nấm N_7 lại thấy rõ sự khác biệt, thể hiện khối lượng sinh khối ướt của chủng N_7 giảm mạnh khi so sánh ở môi trường không bổ sung và có bổ sung kim loại nặng, khi nồng độ muối kim loại tăng lên 700 ppm và ở các nồng độ cao hơn ở 1000 và 1500 ppm thì chủng này không phát triển được, không xác định được lượng sinh khối ướt. Điều này cho thấy sự ức chế đối với vi sinh vật của các kim loại nặng được thể hiện rất rõ ràng đối với các chủng không có khả năng kháng lại các kim loại nặng này.

Iskandar và cộng sự khi nghiên cứu khả

năng hấp thụ kim loại nặng của một số chủng nấm, cho thấy chủng *Trichoderma asperellum* có thể dung nạp với 800 mg/l Cu và 1000 mg/l Pb trong môi trường PDA (Iskandar và cộng sự, 2011).

Hay trong nghiên cứu của tác giả Siddiquee và cộng sự đã đề cập rằng mức độ kháng ở các nồng độ kim loại nặng khác nhau rất đa dạng đối với các chủng nấm sợi *T. aureoviride*, *T. harzianum* và *T. virens* (Siddiquee S, 2013).

Do đó, kết quả tuyển chọn của đề tài khi so sánh với kết quả tuyển chọn của một số tác giả khác trên thế giới cho thấy, khả năng kháng kim loại Cu và Pb của chủng N_{10} tuyển chọn được là khá cao.

3.3. Đánh giá khả năng kháng và hấp thụ đối với các loại kim loại nặng khác nhau của chủng N_{10}

Khi nuôi cấy chủng N_{10} trong môi trường lỏng chứa các kim loại khác nhau ở dải nồng độ từ 500; 700; 1500 và 2000 mg/L. Đánh giá mức độ phát triển thông qua lượng sinh khối khô và hiệu suất hấp thụ kim loại nặng của chủng đã được tiến hành. Kết quả được thể hiện trong bảng 4 và bảng 5.

Bảng 4. Khối lượng sinh khối khô của chủng N_{10} trong môi trường chứa các kim loại

TT	Kim loại	Sinh khối khô của chủng N_{10} (g/L) ở nồng độ khác nhau của các kim loại nặng					
		0	500	700	1000	1500	2000
1	$PbSO_4$	15,89 ± 0,73	13,07 ± 0,45	11,96 ± 0,58	10,05 ± 0,47	9,57 ± 0,58	8,26 ± 0,47
2	$CuSO_4$	15,89 ± 0,73	15,43 ± 0,39	13,48 ± 0,65	12,19 ± 0,52	10,86 ± 0,71	9,04 ± 0,65
3	$Fe_2(SO_4)_3$	15,89 ± 0,73	14,68 ± 0,68	13,77 ± 0,49	12,04 ± 0,63	11,01 ± 0,63	9,72 ± 0,74
4	$ZnSO_4$	15,89 ± 0,73	12,65 ± 0,57	11,91 ± 0,52	10,09 ± 0,68	9,87 ± 0,48	8,79 ± 0,66
5	$AlCl_3$	15,89 ± 0,65	14,32 ± 0,61	13,27 ± 0,44	11,08 ± 0,77	10,76 ± 0,59	9,88 ± 0,54
6	$CdSO_4$	15,89 ± 0,73	12,41 ± 0,58	10,82 ± 0,55	8,29 ± 0,75	6,98 ± 0,45	4,53 ± 0,48

Bảng 5. Hiệu suất hấp thụ với các kim loại nặng: Pb; Cu; Fe; Zn, Cd và Al của chủng N₁₀

TT	Kim loại	Hiệu suất hấp thụ các kim loại ở nồng độ (ppm) khác nhau (%)				
		500	700	1000	1500	2000
1	PbSO ₄	93,36 ± 0,5	93,0 ± 0,7	91,48 ± 0,45	89,92 ± 0,62	82,23 ± 0,45
2	CuSO ₄	90,7 ± 0,42	89,2 ± 0,51	84,17 ± 0,48	78,84 ± 0,5	66,1 ± 0,6
3	Fe ₂ (SO ₄) ₃	89,43 ± 0,71	86,17 ± 0,45	82,26 ± 0,62	79,12 ± 0,71	75,4 ± 0,58
4	ZnSO ₄	90,1 ± 0,39	87,61 ± 0,47	83,75 ± 0,54	80,33 ± 0,6	73,66 ± 0,52
5	AlCl ₃	95,64 ± 0,55	93,57 ± 0,63	90,82 ± 0,45	86,95 ± 0,64	82,08 ± 0,47
6	CdSO ₄	61,87 ± 0,39	55,95 ± 0,41	51,44 ± 0,53	33,27 ± 0,44	16,87 ± 0,52

Kết quả bảng 4 và 5 cho thấy, chủng N₁₀ hấp thụ tốt đối với dải kim loại nặng rộng với hiệu suất hấp thụ cao, cụ thể chủng N₁₀ hấp thụ được 66,1% với Cu; 82,23% với Pb; 75,4% với Fe; 73,66% với Zn; 82,08% với Al và 16,87% với Cd.

Như vậy, với khả năng hấp thụ với các kim loại nặng của chủng N₁₀, có thể khẳng định kết quả tuyển chọn được chủng nấm N₁₀ là kết quả rất khả quan để có thể mở ra hướng ứng dụng

các chủng trong quá trình xử lý sinh học với loại ô nhiễm này.

3.4. Định danh chủng N₁₀

Chủng N₁₀ có khuẩn lạc lớn, hình thành nhiều khía trên bề mặt, sợi khí sinh màu nâu nhạt, sợi cơ chất màu đen. Hệ sợi nấm có vách ngăn, cấu trúc bào tử giống như bàn chải, tạo ra các chuỗi bào tử đơn bào dạng bụi dài màu xanh lục và phân nhánh (Hình 3).



Hình 3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hệ sợi của chủng N₁₀

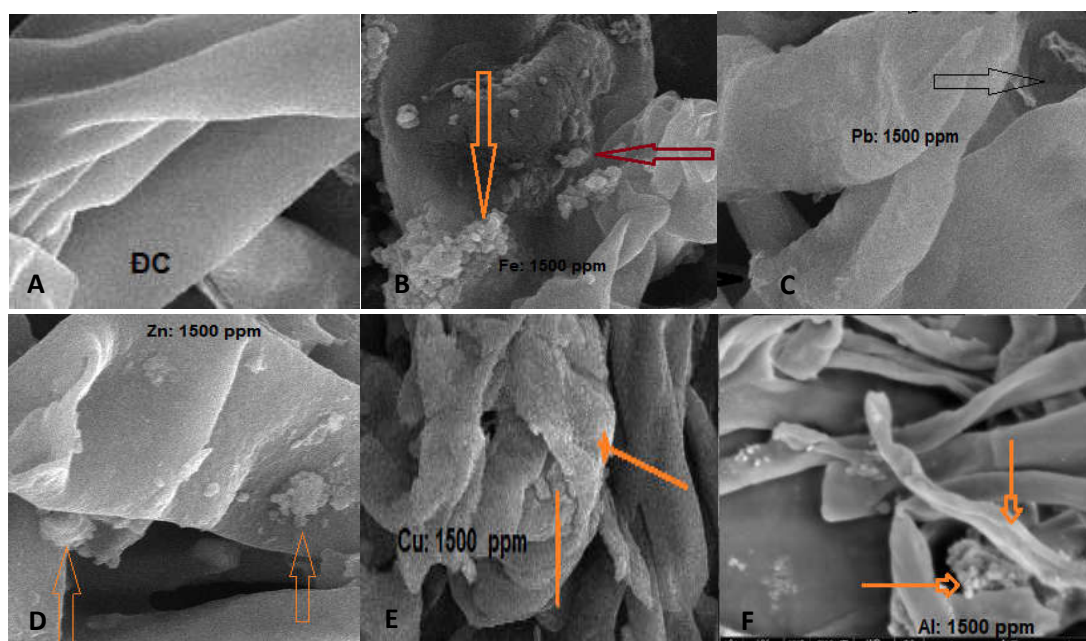
Trình tự gen 28S rRNA của chủng N₁₀:

```
CGAAGGAGCTTCACACGGGCGCGGGCACCCCATCCCAGACGGGATTCTCACCCCTCTATGACGGCCCGTT
CCAGGGCACTTAGATGGGGGCCGCTCCCGAAGCATCCTCTGCAAATTACAATGCGGACCCCGAAGGGGC
CAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCT
CCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAGAAAGATTGAG
GGGGGTCGCCGGCGGGCGCCGGCCGAGAGCGGGTGACGAAGCCCCATACGCTCGAGGACCG
GACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGCCCCCGGGAGCCGGGGGGCGGGGGCCCAACACACAA
GCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTG
CGTTCAAAGACTCGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAGCTAATCGCTCAGACTGCAATCT
TCAGACAGCGTTCAGGGGGGCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGGATGCCCCCGGCGGCCAGACG
GCGGGCCCGCCGAAGCAACTAGGTATGATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTC
GGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCTTAAATGACCGAG
TTTGACCAACTTTCCGGCTCTGGGGGGTCGTTGCCAACCCCTCCTGAGCCAGTCCGAAGGCCTCACTGAGC
CATTCAATCGGTAGTAGCGACGGG
```

Kết quả phân tích trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng N₁₀ bằng phần mềm Sequencing Analysis, đồng thời so sánh trình tự này với cơ sở dữ liệu của GenBank và NCBI bằng phần mềm BLAST cho thấy trình tự này tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng *Penicillium janthinellum* (mã số truy cập: AB293968). Vì vậy chủng N₁₀ được xếp vào chi *Penicillium*, loài *Penicillium janthinellum* và định danh là *Penicillium janthinellum*.

3.5. Xác định vị trí kim loại hấp thụ vào sinh khối chủng *Penicillium janthinellum*

Phương pháp chụp SEM - sử dụng kính hiển vi điện tử quét ở các độ phóng đại và phân giải khác nhau nhằm xác định vị trí, phân bố các hạt khoáng vật có trong cấu trúc vật liệu. Chủng *Penicillium janthinellum* được nuôi cấy trong môi trường lỏng chứa các kim loại nặng ở nồng độ 1500 ppm, đối chứng là mẫu nuôi trong môi trường không chứa kim loại, lắc 150 vòng/ phút ở 30°C, sau 7 ngày thu sinh khối, sấy khô và tiến hành chụp SEM. Kết quả thể hiện như trong hình 4.



Hình 4. Hình ảnh chụp SEM với sinh khối chủng *Penicillium janthinellum* trong môi trường chứa các kim loại nặng ở 1500 mg/L

(A: Đối chứng; B: Fe C: Pb; D: Zn; E: Cu và F: Al)

Khi quan sát hình ảnh chụp SEM của sinh khối nấm có thể thấy rằng: so với đối chứng hệ sợi nấm có bề mặt nhẵn, không thấy xuất hiện các hạt khoáng vật trên và trong hệ sợi. Đối với mẫu sinh khối trong các môi trường chứa kim loại nặng có thể thấy rất rõ: các hạt trắng sáng có thể tập trung thành từng mảng hoặc rải rác được phân bố trên bề mặt hệ sợi hoặc bên trong hệ sợi, bề mặt hệ sợi nấm có sự biến đổi, sần sùi hoặc có nhiều vết rạn, xuất hiện khá nhiều cấu trúc như các kẽ nhỏ và tại đó tập trung các hạt khoáng. Đó chính là các kim loại nặng được sinh khối nấm hấp thụ vào từ môi trường.

Như vậy có thể khẳng định, bước đầu các hạt kim loại nặng được sinh khối nấm hấp thụ vào từ môi trường và phân bố tại vị trí bên trong và bề mặt hệ sợi nấm.

Điều này cũng được lý giải bởi tác giả Geoffrey Michael Gadd khi khẳng định rằng các tế bào vi sinh vật được coi là chất hấp thụ sinh học hiệu quả đối với kim loại do chúng có thể hấp thụ vào thành tế bào hoặc sinh ra một số poly xacarit ngoại bào, hoặc gây kết tủa các kim loại nặng tạo thành đám bên trong hoặc bên ngoài tế bào, hệ sợi nấm hoặc cơ quan khác của tế bào (Geoffrey Michael Gadd,

2010). Khi hấp thụ kim loại vào tế bào, các vi sinh vật có thể khử kim loại xuống trạng thái oxy hóa khử thấp hơn do đó tính di động và độc tính có thể giảm đôi với một số nguyên kim loại (Lloyd và cộng sự, 2003). Tác giả cũng cho rằng, sự tương tác giữa kim loại với các nhóm bề mặt tế bào cụ thể cũng có thể tăng cường hoặc ức chế sự vận chuyển kim loại, liên quan đến quá trình biến đổi kim loại và quá trình khoáng hóa sinh học.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất và nước ở làng nghề sản xuất và tái chế kim loại, chủng *Penicillium janthinellum* đã được phân có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường Hansen thạch đĩa có bổ sung các kim loại nặng Cu; Pb; Al; Fe; Zn; Cd với nồng độ 1500 mg/L. Đồng thời chủng này cũng có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường Hansen dịch thể có bổ sung các kim loại nặng: Cu; Pb; Fe; Al; Zn; Cd ở nồng độ lên tới 1500 mg/L. Bên cạnh đó, chủng nấm mốc này vẫn có thể sinh trưởng và phát triển tại các nồng độ kim loại cao hơn (500-2.000 mg/L), tuy nhiên lượng sinh khối tạo thành giảm dần khi nồng độ kim loại tăng. Khả năng hấp thụ với các kim loại nặng là khác nhau, hiệu suất hấp thụ đối với các kim loại nặng trong môi trường của chủng *Penicillium janthinellum* cũng đã được xác định, lần lượt như sau: ở nồng độ các kim loại đạt tới 2000 mg/L, hiệu suất hấp thụ đạt 66% với Cu; 82,23% với Pb; 75,4% với Fe; 73,66% với Zn; 82,08% với Al và 16,87% với Cd. Với khả năng kháng và hấp thụ với dải kim loại rộng, nồng độ cao, *Penicillium janthinellum* là chủng được coi là có tiềm năng ứng dụng tốt trong xử lý môi trường ô nhiễm góp phần vào thành công của các biện pháp xử lý sinh học ô nhiễm nguồn kim loại nặng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hoàn thành với sự hỗ trợ từ nguồn kinh phí của đề tài cấp cơ sở 2020 - Trường Đại học Lâm nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brady, D., Duncan, J.R (1994). Cation loss during accumulation of heavy metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 16, 543–548.
2. Đặng Vũ Hồng Miên (2015), Hệ nấm mốc ở Việt Nam- phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống, NXB Khoa học và Kỹ Thuật, Hà Nội.
3. Danis, U., Nuhoglu, A., Demirbas (2008). A. Ferrous ion-oxidizing in *Thiobacillus ferrooxidans* batch cultures: Influence of pH, temperature and initial concentration of Fe²⁺. *Fresenius Environ. Bull.* 17, 371–377.
4. Goldstein J., Newbury D. E., Joy D. C., Lyman C. E., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L. and Michael J. R. (2003), "Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis", Springer; 3rd 7. edition.
5. Lloyd, J. R., Lovley, D. R. & Macaskie, L. E. (2003). Biotechnological application of metal-reducing microorganisms, *Adv Appl Microbiol*, 53, pp. 85–128.
6. Lucille C. Villegas, Arlene L. Llamado, Kristine V. Catsao, and Asuncion K. Raymundo (2018), "Removal of heavy metals from aqueous solution by biofilm-forming bacteria isolated from mined-out soil in Mogpog, Marinduque, Philippines", *Philippine Science Letters*, 11 (supplement), pp. 18-27.
7. M Iqbal Hossain, M Nural Anwar (2012)," Isolation and Identification of Heavy Metal Tolerant Bacteria from Tannery Effluents", *Bangladesh J Microbiol*, 29 (1), pp. 23-26.
8. Marques, A.P.G.C., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L (2009). Remediation of heavy metal contaminated soils: Phytoremediation as a potentially promising clean-up technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39, 622–654.
9. N.M. Khalil, H.S. El-Sheshtawy, D. Aman (2016), "Elimination of different heavy metals in contaminated soil using indigenous microorganisms and nanoparticle in the El-Rahawy village, Egypt", *J. Mater. Environ. Sci.* 7 (7), pp. 2603-2616.
10. Nguyễn Lâm Dũng (2010). Vi sinh vật học, Nhà xuất bản Giáo Dục, Hà Nội.
11. Race, M (2017). Applicability of alkaline precipitation for the recovery of EDDS spent solution. *J. Environ. Manag.* 203, 358–363.
11. TCVN [6663-3:2013], về chất lượng nước - lấy mẫu - phần 3: Bảo quản và xử lý mẫu nước.
12. TCVN [7538-2:2005], về chất lượng đất - lấy mẫu- phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.
13. Y. Benmalek, M. L. Fardeau (2016), "Isolation and characterization of metal-resistant bacterial strain from wastewater and evaluation of its capacity in metal-ions removal using living and dry bacterial cells", *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, pp. 2153–2162.

HEAVY METALS TOLERANCE AND BIOSORPTION OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM SAMPLES IN THE METALS RECYCLING CRAFT VILLAGES

Nguyen Nhu Ngoc¹, Dinh Thi Ngoc Lan¹, Nguyen Thi Mai Luong¹

¹Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

From soil and water samples collected in 3 metal recycling craft villages: Da Hoi - Bac Ninh; Dai Bai - Bac Ninh and the lead recycling village of Dong Mai - Hung Yen, 10 strains of filamentous fungi that were capable of tolerance to copper and lead at a concentration of 100 mg/L were isolated. Among them, strain N₁₀ was found to be able to grow well on Hansen agar medium with a concentration at 1500 mg/L of copper and lead as compared to others. Morphological and 28S rRNA sequence analyses indicated that strain N₁₀ belonged to *Penicillium janthinellum* with 100% similarity. Further study about the tolerance to Copper; Lead; Aluminum; Zinc; Iron and Cadmium of *Penicillium janthinellum* in Hansen broth medium had also been carried out. The results revealed that *Penicillium janthinellum* exhibited strong growth in medium added with the range of heavy metals concentration from 500 to 2000 mg/L of each. The absorption efficiency for heavy metals at a concentration of 2000 mg/L in broth medium of each heavy metals of *Penicillium janthinellum* strain was also determined. Accordingly, the heavy metals absorption efficiency is 66.1% with Cu; 82.23% with Pb; 75.4% with Fe; 73.66% for Zn; 82.08% for Al and 16.87% for Cd. The result of SEM scan to determine the position of the heavy metal absorbed in the biomass of strain N₁₀ showed that metallic mineral particles were distributed on the surface and/or inside the mycelium. The surface of the mycelium was found to be changed, roughness or cracks, appearing quite a lot of structures like small crevices and where mineral particles are concentrated. *Penicillium janthinellum* strain have shown a high level of resistance to all metals tested, which makes it an attractive potential candidate for further investigations regarding its ability to remove metals from contaminated soil and waters.

Keywords: Absorption, contamination, isolation, *Penicillium janthinellum*, resistance.

Ngày nhận bài : 02/12/2020
Ngày phản biện : 12/01/2021
Ngày quyết định đăng : 25/01/2021