

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY SINH HỌC HYDROCARBON THƠM ĐA VÒNG CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ BIOREACTOR XỬ LÝ ĐẤT NHIỄM CHẤT ĐỘC HÓA HỌC

Nguyễn Ngọc Bảo, Phan Thị Hoàng Hảo, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thanh Thủy, Vũ Đức Lợi, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Đất nhiễm hỗn hợp 2,3,7,8-TCDD (dioxin), các chất diệt cỏ 2,4,5-T, 2,4-D, sản phẩm phân hủy của chất diệt cỏ TCP, DCP, PAH được xử lý bằng bioreactor kỵ khí không bắt buộc. Từ đất đang xử lý, 4 chủng vi khuẩn sử dụng chrysene và 2 chủng vi khuẩn sử dụng pyrene đã được phân lập. Chủng vi khuẩn BDNR1 có thể phát triển trên môi trường tương tự với nguồn carbon duy nhất là 2,4-D. BDNR1 thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, khuẩn lạc tròn, lồi, trơn, bề mặt ướt, màu trắng đục, kích thước từ 2 - 5 mm. Tế bào BDNR1 hình hạt đậu, kích thước dao động từ chiều ngang từ 0,2 - 0,4 μm và chiều dài từ 0,6 - 0,9 μm . Khuẩn lạc của chủng vi khuẩn BDNR4 có kích thước từ 3 - 6 mm, tế bào thuộc nhóm Gram âm, kích thước dao động 0,4 - 0,6 μm . Sau 7 ngày nuôi cấy, chủng BDNR1 phân hủy 86,2% pyrene, 50% anthracene, naphthalene và phenanthrene, 44,4% fluoranthrene và 20% fluorene; chủng BDNR4 phân hủy 61,5% pyrene, 50% anthracene và naphthalene, 65,3% fluoranthrene, 47% fluorene và 23,1% naphthalene. Dựa trên một số đặc điểm hình thái và trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng vi khuẩn BDNR1 được xếp vào chi *Pseudomonas* và có tên là *Pseudomonas* sp. BDNR1. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng BDNR1 được đăng ký trên GenBank với mã số EU726633.

Từ khóa: Bioreactor kỵ khí không bắt buộc, dioxin, PAH, phân hủy sinh học, *Pseudomonas*

MỞ ĐẦU

Sau chiến tranh, trong đất và trầm tích ở một số địa điểm tại khu vực ở sân bay Đà Nẵng vẫn bị ô nhiễm các chất diệt cỏ chứa dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T); 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); trichlorophenol (TCP), dichlorophenol (DCP). Dioxin được biết đến như là một chất hữu cơ bền vững, gây ung thư và đột biến, được xếp vào loại chất độc sinh thái. Do đó, nhu cầu khử độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin (DCD) và các chất độc khác trong đó có các hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) tại khu vực bãi nhiễm là hết sức cần thiết.

Abe và đồng tác giả (2001) đã sử dụng phương pháp vật lý để giảm thiểu dioxin ô nhiễm trong đất. Gray và đồng tác giả (1995) đã sử dụng γ -radiolysis để biến 2,3,7,8-TCDD thành sản phẩm đỡ độc hơn. Phương pháp cho dioxin bay hơi cùng với hơi nước cũng đã được nghiên cứu bởi Mino và đồng tác giả (2001). Đất nhiễm dioxin ở thành phố Tokorozawa, Nhật Bản đã được làm sạch bằng phương pháp này. Các nhà khoa học cũng đã khử loại Cl của PCB, PAH, chất diệt cỏ trong đất bằng cách sử dụng

Na/NH₃ ở 25°C (Paul *et al.*, 2005). Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học đang nghiên cứu xử lý đất nhiễm chất độc hóa học bằng phân hủy sinh học trong các bioreactor hiếu khí và kỵ khí không bắt buộc. Các tập đoàn và chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy 2,3,7,8-TCDD; 2,4,5-T; 2,4-D đã được công bố trong nhiều công trình liên quan đến loại đất ô nhiễm này. Các vi khuẩn sử dụng 2,4-D được biết đến thuộc các chi *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodospirillum*, *Variovorax*, *Bradyrhizobium* và *Sphingomonas* (Vallaey *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2007), tuy nhiên những nghiên cứu về các chủng vi khuẩn sử dụng PAH từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin chưa nhiều. Nhằm tìm hiểu khả năng loại bỏ PAH của các chủng vi khuẩn từ các mẫu đang xử lý khử độc, các nghiên cứu phân lập, phân loại và các đặc tính sinh học của chúng đã được tiến hành.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, khả năng chuyển hóa PAHs của một số chủng vi khuẩn phân lập từ bioreactor kỵ khí không bắt buộc xử lý đất nhiễm DCD. Nghiên cứu này sẽ là cơ sở khoa học

góp phần quan trọng trong các quá trình công nghệ xử lý khử độc và tiến tới làm sạch các chất ô nhiễm bằng phân hủy sinh học ở tự nhiên cũng như trong hệ thống xử lý kín như bioreactor.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu đất sau một tháng xử lý trong bioreactor bán kỵ khí nhằm khử độc DCD và các chất ô nhiễm trong đó có PAH đã được sử dụng để phân lập vi khuẩn.

Hóa chất

Các hóa chất từ hãng Merck và Sigma: 2,4,5-T; dibenzofuran (DBF); 2,4-D; PAH như naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluorene, fluoranthene, pyrene, chrysene và các hóa chất tinh khiết khác đã được sử dụng trong các nghiên cứu của công trình này. Cặp mồi 341F và 907R được tổng hợp tại hãng Invitrogen™, vector pCR®2.1 (Invitrogen)... Môi trường LB sử dụng trong nuôi cấy *E. coli* trong tách dòng nghiên cứu đoạn gen mã hóa 16S rRNA (Sambrook, Russell, 2001). Dịch chiết đất (DC) chứa 2,3,7,8-TCDD tương đương với tổng độ độc từ 30.000 - 40.000 pg TEQ/ml.

Phương pháp nghiên cứu

Các hydrocarbon thơm đa vòng như naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluorene, fluoranthene, pyrene, chrysene ở nồng độ ban đầu 100 ppm đã được sử dụng như là nguồn carbon và năng lượng duy nhất để đánh giá khả năng phân hủy sinh học của các vi khuẩn phân lập được trong môi trường muối khoáng (Rodrigues *et al.*, 2005). Môi trường CNSH1 là môi trường cho nghiên cứu khả năng phân hủy theo cơ chế đồng trao đổi chất, có thêm các nguồn carbon khác ngoài chất ô nhiễm (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Đánh giá định tính khả năng phân hủy dioxin, 2,4,5-T; 2,4-D, DBF và PAH (với nồng độ ban đầu mỗi chất là 100 ppm), dựa trên sự thay đổi màu của môi trường nuôi cấy.

Phân lập, phân loại và đánh giá khả năng sử dụng PAH, của các chủng vi khuẩn theo các phương pháp đã mô tả trước đây (Rodrigues *et al.*, 2005). Kích thước tế bào vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM JEOL 5410 LV với độ

phóng đại 10.000 lần.

Xác định khả năng chuyển hóa PAHs

Phương pháp xác định khả năng chuyển hóa PAH là phương pháp đo quang phân tử theo phương pháp đã mô tả trước đây (Nguyễn Ngọc Bảo *et al.*, 2008).

Phân loại

Nhân đoạn gen 16S rRNA, xác định trình tự đoạn gen 16S rRNA theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) và đã được mô tả trong công trình trước đây của Nguyễn Bá Hữu và Đặng Thị Cẩm Hà (2007).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Vi sinh vật có khả năng phát triển trên môi trường chứa pyrene và chrysene

Bằng phương pháp làm giàu trên môi trường muối khoáng chứa pyrene là nguồn carbon và năng lượng duy nhất với mẫu đất đang xử lý DCD trong bioreactor kỵ khí không bắt buộc, đã phân lập được hai chủng vi khuẩn ký hiệu BDNR1 và BDNR2, còn trên cùng môi trường bổ sung chrysene, phân lập được bốn chủng vi khuẩn BDNR3, BDNR4, BDNR5 và BDNR6. Sở dĩ 2 loại PAH trên được chọn là do chúng rất khó bị vi sinh vật tấn công và cũng có mặt trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin đang xử lý khử độc.

Trong sáu chủng vi khuẩn này, hai chủng BDNR1 và BDNR4 có khuẩn lạc to, mọc dày, dịch nuôi cấy chuyển màu nhanh và đục hơn những chủng khác. Hai chủng vi khuẩn này được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm hiểu khả năng sử dụng PAH và các chất ô nhiễm khác.

Khả năng phát triển trên DC; 2,4,5-T; 2,4-D; DBF và PAH của BDNR1 và BDNR4

Khả năng phát triển trên DC, 2,4,5-T, 2,4-D và DBF

Hai chủng BDNR1 và BDNR4 được nuôi đồng thời trên hai môi trường muối khoáng và CNSH1 chứa các loại chất ô nhiễm khác nhau để tìm hiểu khả năng phân hủy và khả năng phát triển của chúng trên hai môi trường khác nhau (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng phát triển của chủng BDNR1 và BDNR4 trên môi trường muối khoáng và CNSH1 có bổ sung các chất ô nhiễm khác nhau.

Chất ô nhiễm	Môi trường muối khoáng		Môi trường CNSH1	
	BDNR1	BDNR4	BDNR1	BDNR4
2,4 D	–	+	++	++
2,4,5 T	–	–	++	++
DBF	–	–	++	++
DC	+	–	++	++

Ghi chú: +: Phát triển yếu, môi trường đổi màu nhẹ, có ít sinh khối; ++: Phát triển tốt, môi trường đổi màu rõ, đậm, có nhiều sinh khối; –: Không phát triển, môi trường không đổi màu, không có sinh khối.

Trên môi trường muối khoáng chứa DBF; 2,4,5T; 2,4-D và DC, chủng BDNR1 chỉ sử dụng DC (Bảng 1) và màu của môi trường chuyển thành nâu, còn chủng BDNR4 chỉ sử dụng 2,4-D và môi trường chuyển màu xám. Đây có thể là màu của các sản phẩm phân hủy sinh học. Thường các sản phẩm cất vồng có màu vàng nhạt hay các màu nâu khác nhau phụ thuộc vào các chất khó phân hủy (Field, Sierra-Alvarez, 2008). So với môi trường muối khoáng, sinh khối hai chủng BDNR1, BDNR4 đều nhiều hơn, màu sắc của dịch nuôi cấy đậm hơn khi nuôi cấy hai chủng vi khuẩn này trên môi trường CNSH1 (Bảng 1).

DBF không bị vi sinh vật chuyển hóa trên môi trường muối khoáng có thể vì DBF không có mặt trong đất ở bioreactor kỵ khí không bắt buộc cũng như trong đất nhiễm ở Đà Nẵng, tuy nhiên chất này lại có khả năng bị hai chủng trên chuyển hóa trên môi trường CNSH1, dung dịch nuôi cấy đổi màu nâu nhạt, có nhiều sinh khối... Hai chủng nghiên cứu không sử dụng DBF như nguồn carbon và năng lượng duy nhất. Những chủng này cần nguồn carbon khác để phát triển và sau đó phân hủy DBF. Đây là quá trình đồng trao đổi chất của vi sinh vật và luôn xảy ra trong tự nhiên. Đặc tính quý này của hai chủng vi khuẩn phân lập được là một cơ sở khoa học đóng góp thêm để chứng minh sự thành công của công nghệ phân hủy sinh học bằng tăng cường sinh học hay kích thích sinh học khử độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở quy mô hiện trường hoặc trong bioreactor.

Từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin cũng như đất trong các công thức khử độc loại đất nhiễm này ở khu vực sân bay Đà Nẵng, trong số chín chủng vi khuẩn sử dụng DC thì 5 chủng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường muối khoáng có chứa 2,4-

D dưới dạng đồng trao đổi chất và các tập đoàn vi khuẩn phân hủy 2,4,5-T cũng đã được phân lập.

Đa số các công trình nghiên cứu công bố cho thấy cho thấy, phân hủy sinh học của vi khuẩn hiếu khí các hợp chất dioxin chứa Cl xảy ra thông qua quá trình đồng trao đổi chất (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007).

Khả năng sử dụng PAH của BDNR1 và BDNR4

Tại đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở khu vực sân bay Đà Nẵng và trong tự nhiên, tại các điểm ô nhiễm dầu mỏ, PAH tồn tại ở dạng hỗn hợp của nhiều PAH khác nhau. Do vậy, các vi sinh vật có khả năng phân hủy nhiều PAH khác nhau sẽ đóng vai trò quan trọng trong quá trình làm sạch chất ô nhiễm bằng phân hủy sinh học ở ngay tại khu vực ô nhiễm cũng như trong hệ thống xử lý kín như bioreactor.

Hai chủng BDNR1 và BDNR4 đều có khả năng loại bỏ cả 7 loại PAH từ 2 vòng thơm trở lên ở các mức độ khác nhau sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường khoáng có chứa PAH với nồng độ ban đầu 100 ppm (Bảng 2, Hình 1).

Cả hai chủng đều có khả năng phân hủy tốt pyrene và fluoranthrene. Chrysene là chất rất khó bị vi sinh vật tấn công cũng bị BDNR1 và BDNR4 phân hủy ở mức độ thấp. Đặc biệt, hai chủng này sử dụng các PAH đa vòng thơm như nguồn carbon và năng lượng duy nhất.

Các nghiên cứu về phân lập và khả năng phân hủy đã được nghiên cứu rất nhiều. Hai chủng *Cycloclasticus* N3 và W (Allison *et al.*, 1998) không sử dụng được PAH như fluoranthene, pyrene và chrysene như là nguồn carbon và năng lượng duy

nhất, tuy nhiên theo cơ chế đồng trao đổi chất chủng *Cycloclasticus* N3 có thể phân hủy khoảng 50% các PAH cao phân tử trên với nồng độ ban đầu 1 ppm và bổ sung tới 10 ppm phenanthrene sau 7 ngày.

Bảng 2. Khả năng phân hủy PAH của BDNR1 và BDNR4.

PAH	Khả năng phân hủy (%)	
	BDNR1	BDNR4
Pyrene	86,2	61,5
Chrysene	34,9	14,3
Phenanthrene	50	50
Fluoranthrene	44,4	65,3
Fluorene	20	47
Anthracene	50	50
Naphthalene	50	23,1

Lors và đồng tác giả (2005) đã nghiên cứu xử lý sinh học mẫu đất nhiễm PAH từ một khu vực công nghiệp ở miền Bắc nước Pháp ở điều kiện phòng thí nghiệm với 3 loại hỗn hợp PAH. Sau 245 ngày xử lý, 96% hỗn hợp PAH 3 vòng thơm, 80% hỗn hợp PAH 4 vòng thơm và 80% hỗn hợp 16 loại PAH khác nhau đã lần lượt bị loại bỏ.

Tại Việt Nam, chủng vi khuẩn *Sphingomonas yanoikuyae* MXL-9 phân lập từ cặn dầu thô mỏ Bạch Hổ phân hủy 64,5% phenanthrene và 61,4% anthracene sau 7 ngày nuôi cấy ở nồng độ thấp (La Thị Thanh Phương *et al.*, 2003). Chủng KCP8 phân lập tại Khe Chè (Quảng Ninh) có khả năng phân hủy 76,12% hỗn hợp PAH (phenanthrene, anthracene và fluoranthrene) 79,96% phenanthrene, 71,09% anthracene và 41,01% fluoranthrene trong hỗn hợp PAH sau 7 ngày nuôi cấy ở môi trường muối khoáng (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2003). *Streptomyces* sp. XKDN12 phân lập cũng từ đất nhiễm DCD phân hủy được 32,72% phenanthrene, 49,84% anthracene, 17,85% fluoranthrene trong hỗn hợp 3 PAH và 32,1% DBF sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường muối khoáng với nguồn carbon thứ hai là glucose (Lee *et al.*, 2003).

Khả năng phát triển của BDNR1 trên hai đại

diện PAH khó phân hủy nhất là chrysene, pyrene và các ô nhiễm khác đã được nghiên cứu ở cùng điều kiện. Trong công trình này chỉ có khả năng phân hủy chrysene và pyrene được trình bày ở hình 1. Màu môi trường đã thay đổi rất rõ sau 7 ngày nuôi cấy BDNR1 và phổ sắc ký cho thấy khả năng phân hủy sinh học 2 PAH trên ở mức độ khác nhau, 34,9% đối với chrysene, và 86,2% pyrene.

Trong một công bố trước đây (Nguyễn Ngọc Bảo *et al.*, 2008), chủng BHN1 của tác giả phân lập từ nước thải nhiễm dầu tại kho chứa xăng dầu Hà Nam có khả năng sử dụng 7 loại PAH ở nồng độ ban đầu 100 ppm mỗi PAH sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường muối khoáng, trong đó naphthalene bị phân hủy 38%, phenanthrene 41%, fluorene và fluoranthrene 40% và pyrene là 52%.

Hai chủng BDNR1 và BDNR4 có khả năng sử dụng nhiều loại PAH khác nhau ở mức trung bình. Tuy nhiên, chủng vi khuẩn BDNR1 sử dụng pyrene, là PAH chứa 4 vòng thơm, tốt hơn so với chủng BDNR4.

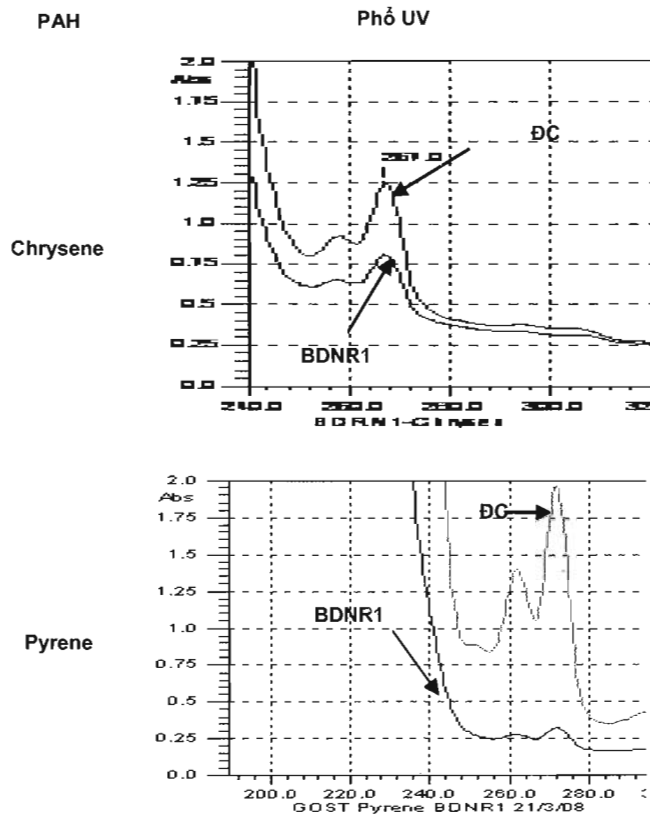
Phân loại hai chủng vi khuẩn BDNR1 và BDNR4

Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào hai chủng vi khuẩn

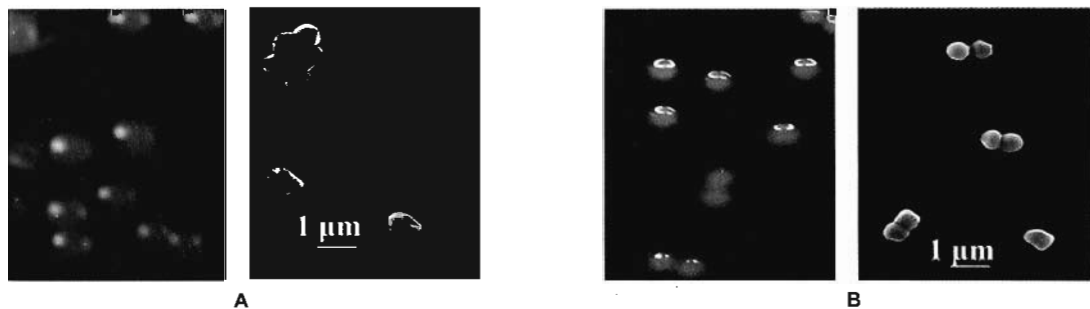
Sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường khoáng bổ sung pyrene, khuẩn lạc chủng vi khuẩn BDNR1 có dạng tròn, lồi, trơn, bề mặt hơi ướt, màu trắng đục, có vòng tròn đồng tâm, đường kính khuẩn lạc từ 2 - 5 mm. Dưới kính hiển vi điện tử quét, tế bào chủng BDNR1 thuộc nhóm Gram âm, dạng hạt đậu, kích thước tế bào từ 0,6 - 0,9 μm $\times$ 0,2 - 0,4 μm (Hình 2A).

Trên môi trường khoáng chứa chrysene, khuẩn lạc của BDNR4 có dạng tròn, lồi, bề mặt ướt, màu trắng đục, kích thước 3 - 6 mm. Tế bào BDNR4 thuộc nhóm Gram âm, hơi tròn, độ dài khoảng từ 0,4 μm tới 0,6 μm (Hình 2B).

Chủng BDNR1 không những có khả năng phân hủy PAH đặc biệt là pyrene mà còn có khả năng phát triển tốt trên môi trường chứa dịch chiết. Vì vậy, trong nghiên cứu này, BDNR1 được chọn phân loại theo phương pháp xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA với kích thước trên 500 bp. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen 16S rRNA đã được gắn vào vector pCR[®]2.1 nhờ T4 DNA ligase và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α .



Hình 1. Khả năng phân hủy PAH của chủng BDNR1.



Hình 2. A. Hình thái khuẩn lạc và tế bào chủng BDNR1. Kính hiển vi phóng đại 10.000 lần. B. Hình thái khuẩn lạc và tế bào chủng BDNR4. Kính hiển vi phóng đại 10.000 lần.

Xác định vị trí phân loại chủng BDNR1 bằng so sánh một phần trình tự gen mã hóa 16S rRNA

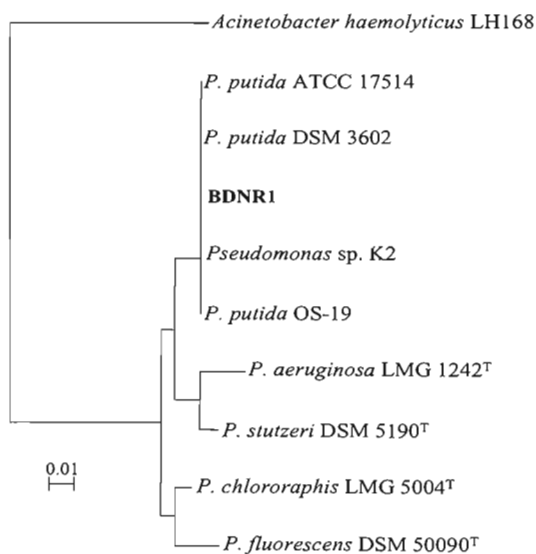
Vị trí trên cây phát sinh chủng loại của BDNR1 đã được xác định bằng trình tự nucleotide đoạn gen 16S rRNA (560 nucleotide) nhân lên được từ DNA

tổng số chủng BDNR1 được đăng ký trên GenBank với mã số EU726633.

Đoạn gen 16S rRNA ở chủng BDNR1 có mức tương đồng 100% với đoạn gen này ở nhiều chủng vi khuẩn thuộc loài *Pseudomonas putida*. Ngoài ra, đoạn gen 16S rRNA ở chủng BDNR1 có mức tương

đồng từ 95 đến 97% với nhiều vi khuẩn thuộc các loài khác nhau của chi *Pseudomonas*.

Tác giả Leach và Lewis (2006) cho biết, các chủng *P. putida* DSM 3601 và DSM 3602 và *P. stutzeri* KC có thể tiết ra PDTCT (pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) giúp chúng có thể loại bỏ hoàn toàn carbon tetrachloride (CT) khỏi vùng nước nhiễm chất này. Trong khi đó, theo Chang và đồng tác giả (2007) chủng *P. putida* OS-19 là vi khuẩn bản địa có khả năng oxy hóa, loại bỏ arsene ở nồng độ cao trong tất cả các mẫu trầm tích và rác lấy tại vùng Myoung-bong (Hàn Quốc). Hai chủng vi khuẩn *P. putida* ATCC 17514 và *P. putida* NCIB 9816 đều có khả năng phân hủy các PAH. *Pseudomonas putida* ATCC 17514 phân hủy tốc độ tối đa phenanthrene $1,4 \pm 0,1$ mg/l/h cao hơn so với phân hủy fluorene $0,8 \pm 0,07$ mg/l/h (Rodrigues et al., 2005). Yang và đồng tác giả (1994) cũng đã tách dòng cụm các gen tham gia chuyển hóa naphthalene, fluorene và phenanthrene từ *P. putida* NCIB 9816 và biểu hiện trong *Escherichia coli* HB101.



Hình 3. Cây phát sinh loại của chủng BDNR1.

Các hợp chất dioxin chứa ít Cl hơn có thể bị phân hủy bởi các vi khuẩn hiếu khí, chúng thuộc các chi của *Sphingomonas*, *Pseudomonas* và *Burkholderia*. Tuy nhiên, có rất ít công bố chi tiết về vi khuẩn thuộc loài *P. putida* có khả năng sử dụng DD và DBF. Hong và đồng tác giả (2000) thông báo chủng *P. putida* PH-01 có khả năng phân hủy DBF

giống DD. Các vi khuẩn sử dụng PAH thuộc chi *Pseudomonas* phải kể đến như: *Pseudomonas cepacia*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. putida*, *P. testosteroni*, *P. vesicularis*, *Pseudomonas* sp. Một số vi khuẩn thuộc loài *P. putida* có khả năng phân hủy PAH như *P. putida* G7 (Lee et al., 2003), *P. putida* ATCC 17514 (Rodrigues et al., 2005), *P. putida* KT2442 (Newton et al., 2005), *P. putida* NCIB 9816, *P. putida* OUS82 (Takizawa et al., 1999).

Nhiều thành viên của chi *Pseudomonas* này có thể sinh trưởng được ở cả điều kiện có và thiếu oxy. Hơn nữa, chủng BDNR1 được phân lập từ bioreactor kỵ khí không bắt buộc xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin và có thể sử dụng các chất ô nhiễm ở cả điều kiện hiếu khí. Trong bioreactor kiểu này oxy cũng luôn luôn có ở nồng độ thấp. Đây là đặc điểm rất quan trọng mà các đại diện của chi *Pseudomonas* có được, vì vậy chúng là vi khuẩn “ăn tạp” nhất và có vai trò vô cùng quan trọng đối với chu trình chuyển hóa vật chất, đặc biệt là các chất ô nhiễm đa vòng thơm. Với các đặc tính kể trên chủng BDNR1 trình bày trong bài báo này đóng những vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa các chất ô nhiễm ở điều kiện tự nhiên cũng như trong các hệ xử lý kín. Chủng này có thể được sử dụng như một ứng cử viên để bổ sung cho xử lý đất nhiễm DCD hay PAH ở các điều kiện có thể điều khiển được như trong bioreactor.

KẾT LUẬN

Đã phân lập được 4 chủng vi khuẩn sử dụng chrysene và 2 chủng vi khuẩn sử dụng pyrene từ đất trong bioreactor kỵ khí không bắt buộc xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin.

Chủng BDNR1 có thể phát triển trên môi trường chứa dioxin và BDNR4 trên môi trường chứa 2,4-D.

Sau 7 ngày nuôi cấy, chủng BDNR1 phân hủy 86,2% pyrene, 34,9% chrysene, 50% anthracene, naphthalene và phenanthrene, 44,4% fluoranthrene và 20% fluorene; chủng BDNR4 phân hủy 61,5% pyrene, 14,3% chrysene, 50% anthracene và phenanthrene, 65,3% fluoranthrene, 47% fluorene và 23,1% naphthalene.

Dựa trên một số đặc điểm hình thái và trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng vi khuẩn BDNR1 được xếp vào chi *Pseudomonas* và có tên là *Pseudomonas* sp. BDNR1 với mã số đăng ký trên GenBank là EU726633.

Lời cảm ơn: Công trình đã được hỗ trợ kinh phí từ đề tài độc lập cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu xử lý tẩy độc một số hợp chất hữu cơ chứa clo bằng phương pháp hóa học, sinh học tiên tiến” và được thực hiện một phần tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abe T, Mizuno H, Noguchi K (2001) A new remediation technique for soils contaminated with dioxins employing vacuum pyrolysis. In: 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutant & POP 54: 157-159.
- Chang JS, Ren X, Kim KW (2008) Arsenic-oxidizing bacteria for indicating the Arsenic-contaminated soil. *J Environ Sci* 20(11): 1348-1355.
- Field JA, Sierra-Alvarez R (2008) Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere* 71: 1005-1018.
- Gray KA, Hilarides RJ (1995) Radiolytic treatment of dioxin contaminated soils. *Radiat Phys Chem* 46(4-6): 1081-1084.
- Hofmann KH, Polnisch E, Kreisei H, Mach H, Schubert M (1992) Degradation of dibenzofuran and dibenzodioxins by fungi. Presented at: Dioxin'92, 12th international Symposium on Chlorinated Dioxin and Related Compounds, Tampere, Finland.
- Hong HB, Chang YS, Choi SD, Park YH. (2000) Degradation of dibenzofuran by *Pseudomonas putida* PH-01. *Wat Res* (34)8: 2404-2407.
- Armenegaud J, Timmis KN (1997) Biodegradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran by bacteria. *J Microbiol* 35(4): 241-252.
- La Thị Thanh Phương, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2003) Phân hủy sinh học hydrocarbon thơm đa nhân (PAHs) bởi chủng vi khuẩn MXL-9 phân lập từ cặn dầu thô của mỏ Bạch Hổ Vũng Tàu. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(1): 109-117.
- Lee K, Park JW, Ahn IS (2003) Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. *J Hazard Mater* (105)1-3:157-67.
- Leach LH, Lewis TA (2006) Identification and characterization of *Pseudomonas* membrane transporters necessary for utilization of the siderophore pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) (PDTC). *Microbiology* 152: 3157-3166.
- Mai Anh Tuấn, Nguyễn Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2004) Nghiên cứu phân loại và khả năng sử dụng hydrocarbon thơm đa nhân bởi chủng xạ khuẩn XKDN19 phân lập từ đất nhiễm chất độc hóa học. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(3): 389-396.
- Meyer S, Moser R, Neef A., Stahl U, Kampfer P (1999) Differential detection of key enzyme of polyaromatic hydrocarbon-degradation bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology* 145: 1731-1741.
- Mino Y, Moriyama Y (2001) Possible remediation of dioxin-polluted soils by steam distillation. *Chem Pharm Bull* 49(8): 1050-1051
- Gomes NC, Kosheleva IA, Abraham WR, Smalla K (2005) Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 21-33.
- Itoh K, Tashiro Y, Uobe K, Kamagata Y, Suyama K, Yamamoto H (2004) Root nodule *Bradyrhizobium* spp. Harbor *IdAa* and *cada*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Appl Environ Microbiol* 70: 2110-2118.
- Nguyễn LH, Itoh K, Suyama K (2007) Diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading bacteria in Vietnamese soil. *Microb Environ* 22(3): 243-256.
- Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2003) Khả năng phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân của một số chủng vi khuẩn phân lập từ thử nghiệm xử lý ô nhiễm dầu tại bãi triều Khe Chè, Cửa Lục, Quảng Ninh. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 42(3): 37-44.
- Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2007) Xác định đoạn gen mã hóa dioxygenaza từ chủng vi khuẩn phân hủy dibenzofuran *Terrabacter* sp. DMA phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng. *Tạp chí Sinh học* 29(3): 83-89.
- Nguyễn Đương Nhã, Nguyễn Ngọc Minh, Nguyễn Ngọc Bảo, Đặng Thị Cẩm Hà (2005) Khả năng phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân và dibenzofuran của chủng xạ khuẩn XKDN12. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(1): 123-132.
- Nguyễn Ngọc Bảo, Đàm Thúy Hằng, Vũ Đức Lợi, Đặng Thị Thu, Đặng Thị Cẩm Hà (2008) Phân hủy sinh học hydrocarbon thơm đa vòng của một số chủng vi khuẩn phân lập từ nước thải nhiễm dầu. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 46(6): 67-75.
- Paul D, Pandey G, Panday J, Jain KR (2005) Assessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends Biotechnol* 23: 135-142.
- Rodrigues AC, Wuertz S, Brito AG, Melo LF (2005) Fluorene and phenanthrene uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: kinetics and physiological aspects. *Biotechnol Bioeng* 90(3): 281-289.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Schechter A, Gasiewicz A (2003) *Dioxin and Health*, 2nd ed. A John Wiley & Sons, Inc, New York.

Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R, Sakai K (1996) Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl Environ Microbiol* 62: 4323-4328.

Takizawa N, Iida T, Sawada T, Yamauchi K, Wang YW, Fukuda M, Kiyohara H (1999) Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. *J Biosci Bioeng* 87(6): 721-31.

Vallaëys T, Persello-Cartieaux F, Rouard N, Lors C, Laguerre G, Soulas G (1997) PCR-RFLP analysis of 16S rRNA, *tfdA* and *tfdB* genes reveals a diversity of 2,4-D degraders in soil aggregates. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 269-278

White PA (2002) The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixture. *Mut Res* 515: 85-98.

Yang Y, Chen RF, Shiaris MP (1994) Metabolism of naphthalene, fluorene and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J Bacteriol* 176(8): 2158-2164.

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON BIODEGRADATION OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM HERBICIDE/DIOXIN DETOXIFICATION BIOREACTOR

Nguyễn Ngọc Bảo, Phan Thi Hoang Hao, Nguyễn Ba Hữu, Nguyễn Thanh Thuy, Vũ Đức Lợi, Đặng Thị Cam Hà*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

From detoxification treatment of herbicide/dioxin contaminated soil in semianaerobic bioreactor, four chrysene degraders and two pyrene degraders were isolated. Among these bacterial strains, only two strains, BDNR1 and BDNR4, were able to utilize soil extraction containing 2,3,7,8-TCDD and 2,4-D, respectively. Both bacterial strains belong to Gram negative. BDNR1 and BDNR4 degraded seven different PAHs such as phenanthrene, anthracene, fluoranthene, naphthalene, fluorene, pyrene and chrysene. After 7 days of incubation, BDNR1 degraded 86.2% pyrene, 50% anthracene, 50% naphthalene, 50% phenanthrene, 44.4% fluoranthene and 20% fluorene; BDNR4 bacterial strain also degraded 61.5 % pyrene, 50% anthracene, 50% naphthalene, 65.3% fluoranthene, 47% fluorene and 23.1% naphthalene. Based on several morphological properties and partial sequence of 16S rRNA gene, BDNR1 strain should belong to the genus *Pseudomonas* and named as *Pseudomonas* sp. BDNR1. The partial sequence of 16S rRNA gene of the strain BDNR1 was deposited in Genbank with an accession number EU726633.

Keywords: Biodegradation, herbicide/dioxin, PAHs, *Pseudomonas*, semianaerobic bioreactor

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38360892; Fax: 84-4-38363144; E-mail: dangcamha@ibt.ac.vn