

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI CHỦNG KỶ KHÍ KHÔNG BẮT BUỘC BDNS3 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN TẠI KHU VỰC SÂN BAY ĐÀ NẴNG

Nghiêm Ngọc Minh, Phạm Ngọc Long, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc BDNS3 đã được phân lập theo phương pháp làm giàu kỵ khí từ hỗn hợp mẫu đất trong hai công thức “chôn lấp tích cực” 10DNT và 100DNT khử độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin (DCĐ) ở Đà Nẵng. Trên môi trường SH1 rắn và dịch chiết đất chứa dioxin, chủng BDNS3 có khuẩn lạc hình tròn nhỏ. Chủng BDNS3 thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que ngắn, không có tiên mao, kích thước trung bình $3 \mu\text{m} \times 0,84 \mu\text{m}$. Dựa trên kết quả so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA, chủng vi khuẩn BDNS3 được xếp vào chi *Bacteroides* và được đặt tên là *Bacteroides* sp. BDNS3. Trình tự nucleotide đoạn gen 16S rRNA của chủng BDNS3 được đăng ký trên GenBank với mã số FJ188412.

Từ khóa: *Bacteroides*, chôn lấp tích cực, dioxin, vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc

ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ năm 1961 đến 1970, quân đội Mỹ đã rải xuống miền Nam Việt Nam hàng chục triệu lít chất diệt cỏ chứa dioxin trên tổng diện tích 17 triệu ha. Thời gian bán hủy của dioxin và các chất tương tự dioxin trong tự nhiên kéo dài, có khi vài chục năm hoặc đến hàng trăm năm (Sinkkone *et al.*, 2000). Tại bãi nhiễm ở khu vực sân bay Đà Nẵng, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) đã được phát hiện ở mức độ rất cao, chiếm tới trên 90% tổng độ độc. Ngoài ra, một lượng không nhỏ các chất phân hủy sinh học của chất diệt cỏ DCP, TCP và PAH cũng đã phân tích được trong các mẫu đất và bùn tại khu vực bị nhiễm độc. Trên thế giới, đã có nhiều phương pháp để xử lý dioxin như hóa học, lý học, thiêu đốt, chôn lấp và phương pháp phân hủy sinh học. Tại Việt Nam, công nghệ phân hủy sinh học cũng đã được nghiên cứu thành công ở quy mô pilot hiện trường trong xử lý đất nhiễm chất độc hóa học chứa dioxin tại “điểm nóng” ở Đà Nẵng. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước về các nhóm vi sinh vật hiếu khí sử dụng chất độc hóa học (Hiraishi, 2003; Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005; Field, Sierra-Alvarez, 2008). Do thời gian nuôi cấy dài, và khó khăn trong việc phân lập chủng sạch, nên chưa có nhiều nghiên cứu về nhóm vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc và kỵ khí. Trong nghiên cứu này, một chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc đã được phân lập theo phương pháp làm giàu trên nguồn dịch

chiết đất chứa dioxin (DCĐ) và được định tên bằng phương pháp xác định và so sánh trình tự gen 16S rRNA. Kết quả nghiên cứu sẽ đóng góp thêm những hiểu biết về nhóm vi sinh vật kỵ khí không bắt buộc trong các lô xử lý ô nhiễm tại sân bay Đà Nẵng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập vi khuẩn

Mẫu đất thu thập từ hai công thức xử lý đất nhiễm DCĐ bằng “chôn lấp tích cực” 10DNT (10 m³) và 100DNT (100 m³) tại khu vực bãi nhiễm ở sân bay Đà Nẵng. Mẫu được lấy ở độ sâu 75 - 100 cm, bảo quản 4°C và phân tích vi sinh vật trong 24 h. Vi khuẩn kỵ khí được phân lập theo phương pháp làm giàu với nguồn DCĐ trên môi trường SH1 (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Hỗn hợp 5 g đất từ hai mẫu 10DNT và 100DNT được cho vào bình trụ thể tích 125 ml có chứa môi trường SH1 dịch và 4 ml DCĐ, nuôi cấy tĩnh trong tối 7 - 10 ngày ở 30°C. Chuyển 10% giống ở lần làm giàu thứ nhất sang bình nuôi cấy thứ hai chứa môi trường SH1 và 4 ml DCĐ. Sau khi làm giàu ba lần, hút 0,5 ml mẫu làm giàu lần ba, pha loãng, sau đó bơm 1 ml dung dịch pha loãng có chứa vi khuẩn vào các ống nghiệm. Đun nóng và làm lạnh nhanh môi trường SH1 thạch và đổ môi trường vào các ống nghiệm chứa 1 ml giống ở các độ pha loãng khác nhau. Sau 7 - 10 ngày nuôi ở 30°C, các khuẩn lạc mọc riêng rẽ trong ống thạch được

tách, chuyển sang nuôi cấy trong bình chứa môi trường SH1 và 4 ml DCD ở 30°C. Kiểm tra độ sạch chủng vi khuẩn bằng quan sát dưới kính hiển vi.

Quan sát hình thái tế bào

Hình thái tế bào của chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc sau khi nuôi trên môi trường SH1 dịch ly tâm và quy trình chuẩn bị mẫu đã được miêu tả trong báo cáo của Đặng Thị Cẩm Hà và đồng tác giả (2005). Quan sát mẫu đã được cố định, làm khô và phủ vàng dưới kính hiển vi điện tử quét JEOL 5410 với độ phóng đại 10.000 lần.

Xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA

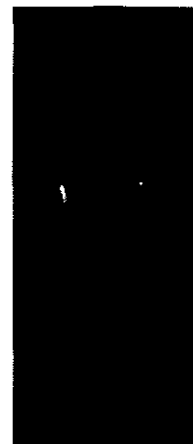
DNA tổng số của vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001). Đoạn gen 16S rRNA được nhân bởi cặp mồi 341F (5'-CCTACGGGAGGCACGAG -3'), 907R (5'-CCGTGAATTCCTTTTAGTTT -3') và DNA tổng số của chủng vi khuẩn. Sản phẩm PCR được gắn vào vector pCR[®]2.1, biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* INVαF⁺, kiểm tra DNA plasmid và xác định trình tự nucleotide đoạn gen 16S rRNA trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Data Analyzer. Trình tự nucleotide được xử lý trên phần mềm Sequencher version 4.0.5. Mức độ tương đồng của đoạn gen 16S rRNA chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc được so sánh với các trình tự gen 16S rRNA trong GenBank và Ribosome Database Project (RDP). Cây phát sinh chủng loại gen 16S rRNA được thiết kế dựa trên các phần mềm Clustal X, Bioedit version 6.0.7, Gendoc, Neibough-Joining (NJ) tree, Mega. Trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA được đăng ký trong GenBank.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và nghiên cứu đặc điểm hình thái

Mẫu làm giàu vi sinh vật từ 2 mẫu đất 10DNT và 100DNT trên môi trường SH1 chứa DCD đều có kết tủa màu đen FeS, mùi H₂S đặc trưng. Chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc BDNS3 đã được phân lập, làm sạch từ mẫu làm giàu trên. Chủng BDNS3 có khả năng phát triển tốt trên môi trường SH1 dịch và thạch rắn có bổ sung DCD. Trong môi trường SH rắn, chủng vi khuẩn BDNS3 làm nứt thạch, tạo khí mạnh mẽ và khuẩn lạc hình tròn nhỏ (Hình 1). Sau 2 năm xử lý, 50 - 70 % tổng độ độc đã bị loại bỏ trong 2 lô xử lý 10DNT và 100DNT khử độc đất nhiễm

DCD bằng phân hủy sinh học kết hợp với chôn lấp (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Trong các nghiên cứu trước đây, một số chủng vi khuẩn, tập đoàn vi khuẩn kỵ khí và kỵ khí không bắt buộc sử dụng DCD, dioxin đã được phân lập (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005; Nguyễn Thị Sánh *et al.*, 2005). Nghiên cứu của Nguyễn Thị Sánh và đồng tác giả (2005) cho thấy, tập đoàn vi khuẩn khử sulfate phân lập từ đất nhiễm DCD ở sân bay Đà Nẵng có khả năng chuyển hóa dioxin. Ngoài ra, chủng vi khuẩn khử sulfate SETDNI phân lập từ đất nhiễm DCD ở Đà Nẵng khi phát triển trên môi trường SH1 rắn không có hiện tượng tạo khí mạnh mẽ gây nứt thạch (Nguyễn Thị Sánh *et al.*, 2005) như quan sát ở chủng BDNS3. Kết quả trong nghiên cứu này và các nghiên cứu trước đây cho thấy, các chủng vi khuẩn phân lập từ đất khu vực nhiễm DCD ở Đà Nẵng có đặc tính sinh học khác nhau và các chủng này có thể đóng vai trò nhất định trong quá trình khử các hợp chất ô nhiễm vòng thơm chứa chlorine ở trong cả đất nhiễm và đất được xử lý bằng phân hủy sinh học. Tuy nhiên, cần có thêm phân tích hóa học (ví dụ phân tích trên GC-MS) để khẳng định vai trò thực sự của các chủng vi khuẩn này trong quá trình khử loại chlorine.



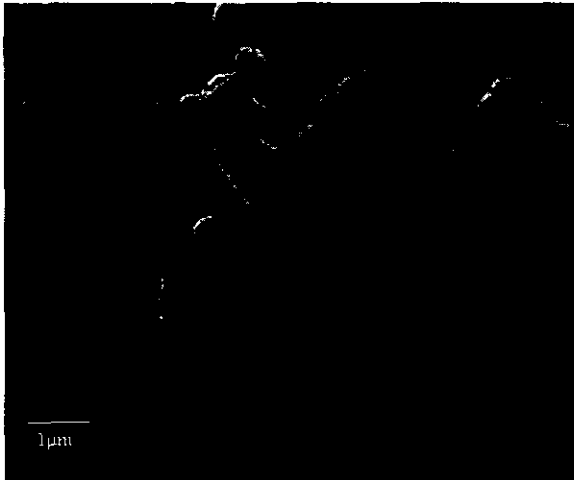
Hình 1. Môi trường SH1 rắn (C) và phát triển của chủng BDNS3 trên môi trường SH1 rắn (1).

Chủng vi khuẩn BDNS3 thuộc nhóm Gram âm, tế bào hình que, không có tiên mao, kích thước trung bình 3 μm × 0,84 μm (Hình 2).

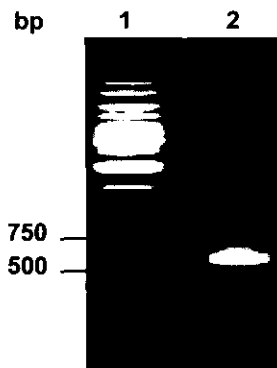
Xác định trình tự nucleotide đoạn gen mã hóa 16S rRNA

DNA tổng số của chủng BDNS3 được tách sạch và sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen mã hóa 16S

rRNA. Kết quả ở hình 3 cho thấy, sản phẩm PCR thu được đặc hiệu và có kích thước lớn hơn 500 bp.



Hình 2. Hình thái tế bào của chủng vi khuẩn BDNS3 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).



Hình 3. Phổ điện di sản phẩm PCR. 1: Thang DNA chuẩn 1 kb; 2: Sản phẩm PCR của chủng vi khuẩn BDNS3.

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pCR®2.1 và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* INVαF'. Một trong số những khuẩn lạc có chứa plasmid mang đoạn DNA ngoại lai đã được tách chiết, làm sạch để xác định trình tự nucleotide.

Kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn gen 16S rRNA ở chủng vi khuẩn BDNS3 và xây dựng cây phát sinh chủng loại cho thấy, chủng BDNS3 gần gũi nhất với các dòng vi khuẩn không nuôi cấy và vi khuẩn thuộc chi *Bacteroides* (Hình 4). Trình tự

đoạn gen 16S rRNA chủng vi khuẩn BDNS3 có mức tương đồng 99,4% với đoạn gen 16S rRNA của các dòng vi khuẩn không nuôi cấy EV818BHEB5102502SAR27F86, dòng làm giàu vi khuẩn khử sắt CL-W2, 98,3% với vi khuẩn *Bacteroides* sp. Z4 và 99,4% với *Bacteroidales* bacterium JN18_V15_G.

Dựa trên một số đặc điểm hình thái và xác định trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn BDNS3, chủng vi khuẩn này có thể được xếp vào chi *Bacteroides* và có tên là *Bacteroides* sp. BDNS3. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn BDNS3 đã được đăng ký trên GenBank với mã số là FJ188412.

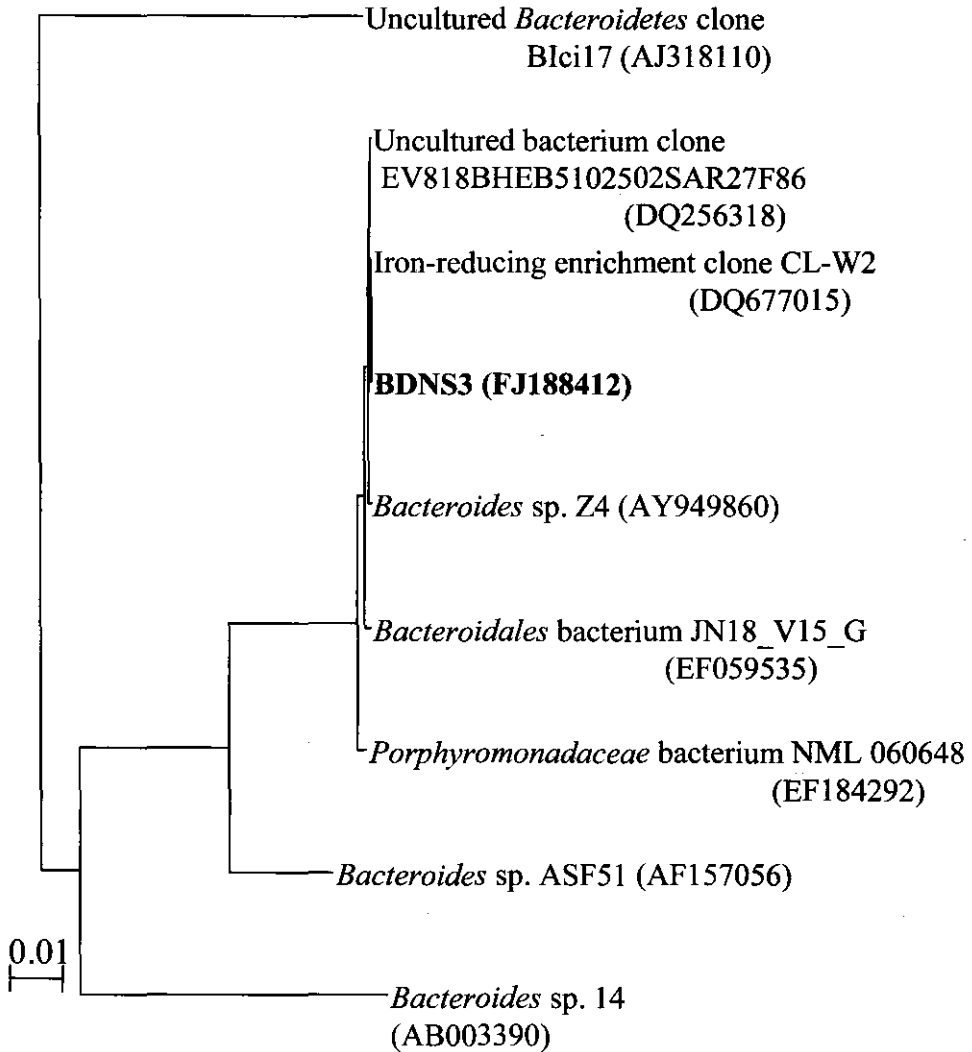
Theo công bố gần đây nhất của Bedard và đồng tác giả (2007) cho thấy, vi khuẩn họ *Bacteroidales* cùng với *Clostridiales* và *Dehalococcoides* thuộc nhóm *Chloroflexi* đã được phát hiện trong trầm tích sông nhiễm Aroclor 1260 (một dạng tên thương mại của hỗn hợp các polychlorinated biphenyl-PCB). Các tác giả đã phát hiện, kháng sinh vancomycin làm giảm tỷ lệ vi khuẩn nhóm *Bacteroidales* và *Clostridiales* trong khi đó làm tăng gấp đôi tỷ lệ của nhóm *Dehalococcoides* lên tới 25% tổng số vi khuẩn (Bedard *et al.*, 2007). Zang và đồng tác giả (2005) cũng đã công bố trình tự gen của *Bacteroides* sp. Z4 phân lập từ nước thải của nhà máy giấy chứa hợp chất vòng có chlorine (Zang *et al.*, 2005). Kimura và đồng tác giả (2003) cũng đã phát hiện được vi khuẩn *Actinobacteria*, *Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides*, *Verrucomicrobia* và *Nitrospira* trong reactor xử lý 2,4-dinitrophenol. Nghiên cứu khác của Mannisot và đồng tác giả về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong nước ngầm nhiễm pentachlorophenol (PCP) cho thấy, các vi khuẩn phân hủy PCP thuộc 16 nhóm vi khuẩn Gram âm như *Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides*, trong khi đó vi khuẩn Gram dương có quan hệ gần gũi với *Nocardioidea* (Mannisto *et al.*, 2001). Hiraishi và đồng tác giả (2005) đã phát hiện ra sự có mặt của *Bacteroidales*, *Firmicutes* và *Proteobacteria* là những vi khuẩn chính trong các mẫu làm giàu vi sinh vật trong một năm của trầm tích sông trộn với đất nhiễm dioxin.

Các kết quả nghiên cứu gần đây của Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả (2007) và Nguyễn Bá Hữu và Đặng Thị Cẩm Hà (2008) cũng đã phát hiện các dòng vi khuẩn *Bacteroides* trong đất ở các công thức xử lý khử độc đất nhiễm chất diệt cỏ (CDC) quy mô 0,5 m³ và 1,5 m³ ở Đà Nẵng bằng phân hủy sinh học.

Các kết quả nghiên cứu trước đây và trong nghiên cứu này cho thấy vi khuẩn thuộc nhóm

Bacteroides có mặt ở các điểm ô nhiễm các hợp chất vòng thơm. Tuy nhiên, cần có thêm các phân tích hóa học cũng như các nghiên cứu sinh hóa về phân hủy các CDC để làm sáng tỏ hơn nữa vai trò của các

chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc trong quá trình tự làm sạch các chất ô nhiễm ở ngoài tự nhiên cũng như trong quá trình xử lý ở phòng thí nghiệm và hiện trường bằng phân hủy sinh học.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn BDNS3 và một số chủng đại diện. Thước đo thể hiện 1 nucleotide khác nhau trên 100 nucleotide so sánh.

KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc BDNS3 có khả năng phát triển trên nguồn dịch chiết đất chứa dioxin đã được phân lập theo phương pháp làm giàu từ mẫu đất trong hai công thức “chôn lấp tích cực” 10DNT và 100DNT khử độc đất nhiễm DCĐ ở Đà Nẵng. Trong môi trường SH1 rắn, chủng vi khuẩn BDNS3 làm nứt thạch, khuẩn lạc hình tròn nhỏ.

Chủng BDNS3 thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, tế bào dạng hình que ngắn, không có tiên mao, kích thước trung bình 3 μm x 0,84 μm . Dựa trên kết quả so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA, chủng vi khuẩn BDNS3 được xếp vào chi *Bacteroides* và được đặt tên là *Bacteroides* sp. BDNS3. Trình tự nucleotide đoạn gen 16S rRNA của chủng BDNS3 được đăng ký trên GenBank với mã số FJ188412.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bởi kinh phí của đề tài cơ bản “Ứng dụng một số kỹ thuật sinh học phân tử để nghiên cứu đa dạng vi khuẩn kỵ khí (khử sulfat và loại khử clo) trong tập đoàn vi sinh vật nhận được từ các lô xử lý chất độc bằng công nghệ phân hủy sinh học”. Công trình được thực hiện có sự dụng một số trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bedard DL, Ritalahti KM, Frank E, Löffler FE (2007) The *Dehalococcoides* population in sediment-free mixed cultures metabolically dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1260. *Appl Environ Microbiol* 73(8): 2513-2521.

Đặng Thị Cẩm Hà, Phạm Hữu Lý, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thị Đệ, Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Đương Nhã, Mai Anh Tuấn, La Thanh Phương, Nguyễn Thị Sánh, Nguyễn Thu Thủy, Đỗ Bích Thanh, Đỗ Ngọc Tuyên, Nguyễn Văn Minh, Nguyễn Văn Hồng (2005) Báo cáo nghiệm thu đề tài nhà nước “Nghiên cứu, phát triển công nghệ phân hủy sinh học và kỹ thuật nhà chặm làm sạch ô nhiễm chất độc hóa học trong đất” thuộc chương trình 33. Trung tâm thông tin khoa học và công nghệ Quốc gia, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Field JA, Sierra-Alvarez R (2008) Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere* 71: 1005-1018.

Hiraishi A (2003) Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilisation in bioremediation. *Microb Environ* 18: 105-125.

Hiraishi A, Kaiya S, Miyakoda H, Futamata K (2005)

Biotransformation of polychlorinated dioxin and microbial community dynamics in sediment microcosms at different contamination levels. *Microb Environ* 20: 227-242.

Kimura N, Shinozaki Y, Lee TH, Yonezawaj Y (2003) The microbial community in a 2,4-dinitrophenol-digesting reactor as revealed by 16S rDNA gene analysis. *J Biosci Bioengineer* 76(1): 70-75.

Mannisto MK, Salkinoja-Salonen MS, Puhakka JA (2001) In situ polychlorophenol bioremediation potential of the indigenous bacterial community of boreal ground water. *Wat Res* 35(10): 2496-2504.

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2008) Nghiên cứu sự biến động cấu trúc của tập đoàn vi sinh vật trong quá trình xử lý đất bị nhiễm chất diệt cỏ chứa đi-ô-xin ở qui mô hiện trường bằng công nghệ phân hủy sinh học. *Tạp chí Sinh học* 30: 55-61.

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, Nông Văn Hải, Dietmar H Pieper (2007) Tính đa dạng của cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong quá trình xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở qui mô nhỏ hiện trường. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(2): 255-264.

Nguyễn Thị Sánh, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2005) Phân loại và nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng lên sự phát triển của chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc SETDN1 từ đất nhiễm độc hóa học tại Đà Nẵng. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(2): 257-264.

Sinkkone S, Paaivirta J (2000) Degradation half-life time of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Chemosphere* 40: 943-949.

Zang Y, Chen S (2005) *Bacteroides* sp. strain Z4, from paper mill waste water. (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_seqrecord_detail.jsp?seqid=S000514476).

CHARACTERISTICS OF FACULTATIVE ANAEROBIC BACTERIUM STRAIN BDNS3 ISOLATED FROM HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL IN DANANG AIRPORT AREA

Nghiêm Ngọc Minh*, Phạm Ngọc Long, Nguyễn Ba Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà

Institute of Biotechnology

SUMMARY

The facultative anaerobic bacterial strain BDNS3 was isolated from mixture of two soil samples that collected in “active landfill” biotreatment field experiments 10DNT and 100DNT for detoxification of herbicide/dioxin contaminated soil in former US military base in Danang airport area, by enrichment

* Author for correspondence: Tel: 84-4-39947243; Fax: 84-4-38363144; E-mail: nghiemminh@ibt.ac.vn

procedure. Bacterial strain BDNS3 was able to grown in SH1 medium supplied with dioxin containing soil extracted solution and produce H₂S gas. The cells of BDNS3 strain are Gram negative and short rod sharpe, no flagella and evarage size is 3 μm × 0.84 μm. Based on morphological characteristics and analysis of partial sequence of 16S rRNA gene, BDNS3 bacterial strain should be placed in genus *Bacteroides* and named as *Bacteroides* sp. BDNS3. The nucleotide sequence of 16S rRNA gene fragment of BDNS3 bacterial strain was deposited in GenBank with assession number FJ188412.

Keywords: “active landfill”, *Bacteroides*, dioxin, facultative anaerobic bacteria