

TÍNH ĐA DẠNG CỦA CẤU TRÚC TẬP ĐOÀN VI KHUẨN TRONG QUÁ TRÌNH XỬ LÝ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN Ở QUY MÔ NHỎ HIỆN TRƯỜNG

Nguyễn Bá Hữu¹, Đặng Thị Cẩm Hà¹, Nông Văn Hải¹, Dietmar H. Pieper²

¹Viện Công nghệ Sinh học

²Trung tâm Nghiên cứu Bệnh truyền nhiễm Helmholtz (GBF), Cộng hòa Liên bang Đức

TÓM TẮT

Công nghệ phân hủy sinh học đang được ứng dụng rộng rãi trong xử lý làm sạch các chất ô nhiễm do giá thành hạ và thân thiện với môi trường. Công nghệ này đã và đang được áp dụng xử lý tẩy độc ở các quy mô khác nhau đối với đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng. Kết quả phân tích GC-MS độ tồn dư dioxin trong đất cho thấy hiệu quả rõ rệt của quá trình tẩy độc ở quy mô 0,5 m³. Biến động tập đoàn vi sinh vật trong những nghiên cứu trước đây đều sử dụng kỹ thuật nuôi cấy, do đó kết quả không phản ánh chính xác cấu trúc tập đoàn vi sinh vật. Trong nghiên cứu này, phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn (single strand conformation polymorphism - SSCP) gen 16S rRNA đã được áp dụng để nghiên cứu biến động cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong các công thức xử lý ở quy mô 0,5 m³. Cấu trúc tập đoàn vi khuẩn không biến động nhiều giữa ba lần lấy mẫu ở công thức đối chứng không xử lý 0,5DN5. Tuy nhiên, giữa các công thức xử lý và giữa các đợt lấy mẫu cũng thấy sự thay đổi về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn. Các công thức xử lý có sự đa dạng vi khuẩn hơn so với công thức đối chứng 0,5DN5. Sự bổ sung nguồn carbon của công nghiệp mía đường ở công thức xử lý 0,5DN4 có thể đã làm giảm sự sinh trưởng của các tập đoàn vi khuẩn. Hai công thức xử lý 0,5DN2 và 0,5DN3 có tỷ lệ carbon bổ sung hợp lý dẫn đến gia tăng sự đa dạng vi khuẩn so với các công thức khác. Các dòng tách từ gel SSCP thuộc 7 lớp vi khuẩn bao gồm *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Clostridia*, *Actinobacteria*, *Bacteroides* và *Bacilli*. Một số dòng có quan hệ gần gũi với các vi khuẩn kỵ khí *Clostridium*, *Tissierella*. Vi khuẩn kỵ khí tùy tiện *Lactobacillus* và *Dysgonomonas mossii*. Các chi vi khuẩn *Escherichia* và *Citrobacter* cũng được phát hiện trong các công thức xử lý. Các vi khuẩn *Pseudomonas* trong đó có *Pseudomonas stutzeri* và các vi khuẩn thuộc các chi *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Kerstersia*, *Delftia* trong lớp *Betaproteobacteria* chiếm ưu thế trong các công thức xử lý. Nhiều vi khuẩn thuộc các chi này có khả năng phân hủy 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) và dioxin. Kết quả trong nghiên cứu này sẽ là các cơ sở khoa học hữu ích giúp các nhà khoa học và công nghệ trong việc nâng cao tốc độ tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin cũng như các loại chất độc hóa học khác ở Việt Nam.

Từ khóa: Cấu trúc tập đoàn vi khuẩn, chất diệt cỏ, dioxin, phân hủy sinh học, SSCP, tẩy độc, 16S rRNA

ĐẶT VẤN ĐỀ

Chiến tranh Việt Nam đã qua đi hơn 30 năm, tuy nhiên một số hậu quả của nó vẫn đang ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe con người. Hàng chục triệu lít thuốc diệt cỏ chứa dioxin đã được quân đội Mỹ phun rải xuống nhiều vùng ở miền trung và nam Việt Nam (Stellman *et al.*, 2003) trong thời gian từ 1961 đến 1971. Hiện nay, nhiều vùng trong đó có các căn cứ quân sự cũ tại các sân bay Đà Nẵng, Biên Hòa và Phù Cát vẫn bị ô nhiễm nặng 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin), 2,4,5-T, 2,4-D, dichlorophenol (DCP), trichlorophenol (TCP). Công nghệ phân hủy sinh học với ưu điểm là giá thành thấp và an toàn với môi trường đang được

triển khai xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng và có các kết quả rất tốt. Các nghiên cứu vi sinh vật trước đây mới chỉ tập trung vào các nhóm nuôi cấy được (Dang *et al.*, 2002; Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Tuy nhiên, các công bố cho thấy vi sinh vật nuôi cấy được chỉ chiếm khoảng 0,01 - 10% tổng số vi sinh vật ở tự nhiên (Keller *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2004). Do vậy, nhu cầu đánh giá đa dạng thực tế cũng như biến động cấu trúc tập đoàn vi sinh vật trong tự nhiên cũng như trong quá trình xử lý là hết sức cần thiết và quan trọng. Hiện nay, một số kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phân tích nucleic acid trong đó có phân tích SSCP của gen 16S rRNA đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh

thái học vi sinh vật (Schwieger, Tebbe, 1998; Kirk *et al.*, 2004; Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2007a, b). Trong nghiên cứu này, kỹ thuật SSCP đã được sử dụng để đánh giá biến động cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong các công thức xử lý tầy độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng ở quy mô nhỏ hiện trường. Trong công trình này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích đánh giá sự biến động của tập đoàn vi khuẩn ở ba lần lấy mẫu cách nhau sáu tháng với sự bổ sung các chất “nuôi” vi sinh vật và điều kiện môi trường khác nhau. Mục đích của nghiên cứu là tạo cơ sở khoa học để tăng tốc độ khử độc. Các kết quả thu được sẽ giúp các nhà khoa học và công nghệ điều khiển hoạt động của các nhóm vi sinh vật để tăng khả năng chuyển hóa, phân hủy các chất diệt cỏ chứa dioxin.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu đất nhiễm

Đất trong khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin căn cứ quân sự cũ ở sân bay Đà Nẵng được lấy ở diện tích khoảng 3 m², chiều sâu 60 cm. Đất được trộn đều và sau đó lấy 500 kg đất cho vào các thùng nhựa có thể tích 0,75 m³. Thí nghiệm khử độc được tiến hành ở 4 thùng ký hiệu từ 0,5DN1 đến 0,5DN4. Các thùng này được bổ sung nước, nguồn nitơ, phosphor, chất hoạt động bề mặt sinh học và các nguồn carbon... Thùng thứ 5 là công thức đối chứng không xử lý (0,5DN5). Mẫu đất trong các công thức được lấy ở 3 đợt, mỗi đợt cách nhau khoảng 6 tháng. Mẫu được bảo quản ở 4°C đến khi phân tích.

Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA tổng số và PCR

DNA tổng số từ các mẫu đất được tách và làm sạch theo Fast Prep Soil DNA Extraction Kit (Bio101). Cặp mồi Com1 và Com2 được dùng để nhân đoạn gen 16S rRNA khoảng 400 bp trong vùng V4 đến V5 (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2007b). Hỗn hợp 50 µl phản ứng PCR và chu trình nhiệt được thực hiện như đã mô tả (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2007b).

PCR-SSCP

Sản phẩm PCR được làm sạch bởi kit QIAquick (QIAGEN) và tiến hành cắt sợi đơn có mồi Com2 bằng lamda exonuclease ở 37°C trong 3 h. Tiến hành làm sạch DNA sợi đơn, hòa trong 6 µl chất mẫu SSCP và biến tính DNA ở 94°C trong 3 phút, sau đó

chuyển ngay lập tức mẫu sang điều kiện lạnh. Tiến hành điện di mẫu DNA trên thiết bị Bio-Rad DCode™ ở 250V (30 mA), 18 h, nhiệt độ 20°C trên gel MDE0,625X, 20 cm × 20 cm × 0,75 mm trong đệm TBE1X. Mẫu DNA được nhuộm bạc, cắt và thổi các băng DNA từ gel khô.

Xác định trình tự gen và phân tích đa dạng dựa trên cây phát sinh loài

Trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA được xác định trực tiếp trên máy xác định trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer với bộ hóa chất sinh chuẩn Big Dye Terminator (Perkin – Elmer, Mỹ). Kết quả trình tự nucleotide được xử lý trên phần mềm Sequencher version 4.0.5. Mức độ tương đồng của các đoạn gen 16S rRNA trong các mẫu đất được so sánh với các trình tự gen 16S rRNA trên GenBank và Ribosome Database Project. Cây phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự gen 16S rRNA được thiết kế theo mô tả của Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả (2007b). Các trình tự đoạn gen 16S rRNA được đăng ký trên GenBank.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA tổng số và nhân đoạn gen 16S rRNA từ các mẫu đất

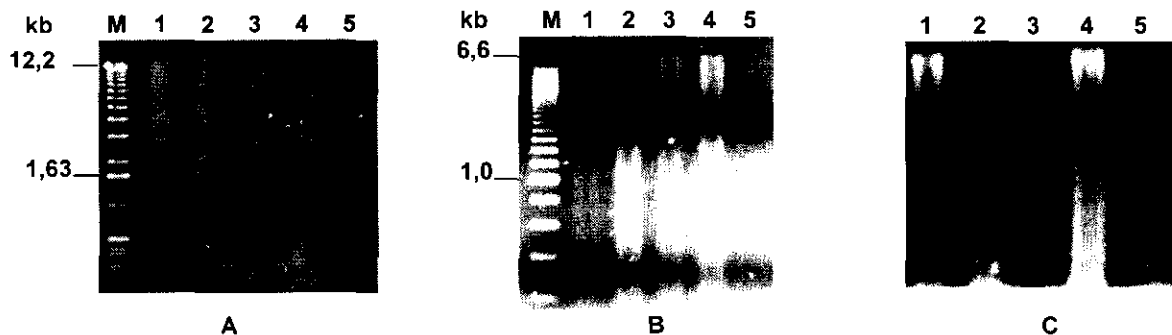
DNA tổng số của 15 mẫu đất được chiết và làm sạch theo kit Fast Prep Soil DNA Extraction. Kết quả điện di đồ hình 1 cho thấy DNA tổng số từ các công thức xử lý 0,5DN1 đến 0,5DN4. Cả ba đợt lấy mẫu đều không nhìn thấy DNA tổng số ở công thức không xử lý 0,5DN5. Kết quả này cũng phù hợp với các kết quả phân tích số lượng vi sinh vật (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2004). Số lượng vi sinh vật trong các công thức xử lý bằng phân hủy sinh học đều cao hơn so với ở công thức 0,5DN5. Tuy nhiên, khi tiến hành PCR nhân vùng V4 đến V5 gen 16S rRNA đều thu được sản phẩm PCR có kích thước khoảng 400 bp như toán lý thuyết từ DNA tổng số của tất cả các mẫu.

Đa dạng vi sinh vật trong các mẫu đất nhiễm chất độc hóa học

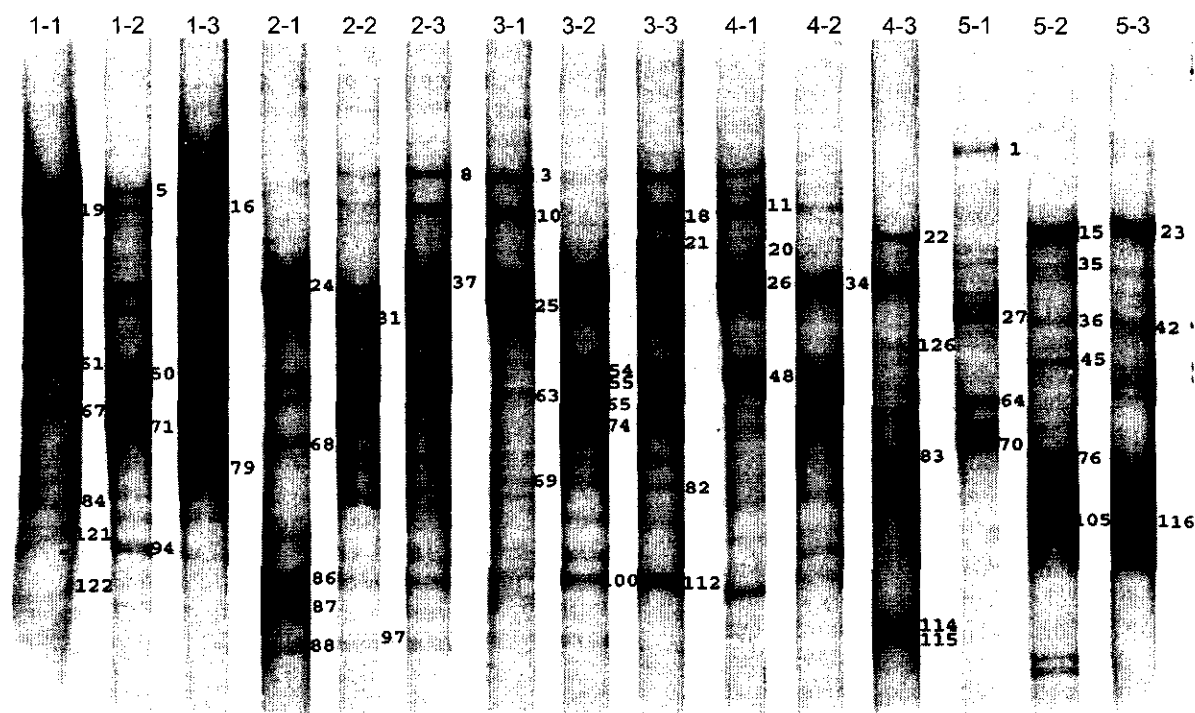
Sản phẩm PCR được làm sạch, cắt sợi đơn có mồi gắn gốc phosphate bằng exonuclease và sau đó phân tách các sợi đơn trên gel acrylamide như mô tả ở phần phương pháp (Hình 2). Kết quả cho thấy mức độ đa dạng khác nhau giữa các công thức xử lý và giữa các đợt lấy mẫu. Công thức đối chứng 0,5DN5

có độ đa dạng thấp hơn cả so với các công thức xử lý. Trong công thức không xử lý 0,5DN5 thành phần nhóm vi sinh vật giữa đợt 2 và 3 không có thay đổi đáng kể. Ở đợt lấy mẫu thứ nhất, thành phần nhóm vi khuẩn có khác so với hai đợt lấy mẫu sau này,

mẫu đất đợt này khô hơn và số lượng vi sinh vật hiếu khí thấp hơn. Hai đợt lấy mẫu sau, đất có độ ẩm cao hơn do lượng nhỏ nước mưa đã lọt vào trong thùng xử lý và có thể là nguyên nhân làm gia tăng số lượng vi sinh vật (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm tách DNA tổng số các mẫu xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin. 1-5: 0,5DN1 đến 0,5DN5, M: thang DNA chuẩn. A: đợt 1 - marker X (Roche), B: đợt 2 - 200 bp (Promega), C: đợt 3.



Hình 2. Điện di đồ SSCP đoạn gen 16S rRNA các tập đoàn vi khuẩn ở trong các công thức tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin. 1: 0,5DN1, 2: 0,5DN2, 3: công thức xử lý 0,5ND3, 4: công thức xử lý 0,5DN4, 5: công thức xử lý 0,5ND5. 1-1, 1-2... đến 5-3, tương ứng với ba đợt lấy mẫu ở 5 công thức xử lý. Số ghi bên phải các băng DNA là tên của các dòng được xác định trình tự nucleotide.

Mục đích của thử nghiệm này là lựa chọn các nguồn nguyên liệu rẻ và có sẵn ở Việt Nam kết hợp với các nguồn dinh dưỡng khác và thay đổi một số yếu tố môi trường trong công thức xử lý, từ đó đưa ra quy trình xử lý hiệu quả. Quan sát hình 2 cho thấy có sự khác biệt về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong 4 công thức xử lý. Đa dạng vi khuẩn trong công thức 0,5DN4 thấp hơn so với ở ba công thức xử lý còn lại. Trong công thức này nguồn carbon bổ sung là sản phẩm phụ trong công nghiệp mía đường nên có thể đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi sinh vật. Hai công thức 0,5DN2 và 0,5DN3 có tỷ lệ cân đối hơn giữa nguồn carbon không phải là sản phẩm phụ trong công nghiệp mía đường nên có lẽ đã thúc đẩy sự sinh trưởng của nhiều nhóm vi sinh vật.

Kết quả phân lập vi khuẩn trên môi trường giàu dinh dưỡng cho thấy có khoảng 8 loại vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc khác nhau (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2004). Tuy nhiên, trên gel SSCP số lượng băng DNA nhiều hơn hẳn. Một số băng DNA đậm và đặc trưng đã được cắt từ gel và xác định trình tự. Kết quả ở bảng 1 và hình 2 cho thấy các dòng thuộc 7 lớp vi khuẩn khác nhau. Các lớp này bao gồm *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Clostridia*, *Actinobacteria*, *Bacteroides* và *Bacilli*. Một công bố của Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả (2007b) cho thấy sự tồn tại của 5 lớp vi khuẩn bao gồm *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, và *Acidobacteria* trong 9 mẫu tại bãi nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở Đà Nẵng. Như vậy, trong nghiên cứu này đã phát hiện thêm sự có mặt của ba lớp vi khuẩn *Clostridia*, *Bacteroides* và *Bacilli*. Tuy nhiên, nhóm vi khuẩn ưa acid *Acidobacteria* chưa được tìm thấy trong số các dòng ở các công thức xử lý. Nguyên nhân để lý giải điều này có thể do lượng mẫu của đợt thí nghiệm chưa đủ lớn, hơn nữa trong quá trình xử lý pH đất tăng lên do các sản phẩm phân hủy sinh học tạo ra và dao động ở mức trung tính và kiềm nhẹ nên có thể đã hạn chế hoặc ức chế sự sinh trưởng của nhóm vi khuẩn *Acidobacteria*.

Nhìn chung, cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong công thức đối chứng không xử lý 0,5DN5 ở cả ba đợt lấy mẫu đều cơ bản giống như ở kết quả khảo sát trước đây của Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả (2007b). Hai chi vi khuẩn chiếm ưu thế đó là *Burkholderia* và vi khuẩn ưa acid *Acidocella* thuộc lớp *Alphaproteobacteria*. Trong đó, vi khuẩn chi *Burkholderia* được biết đến nhiều với khả năng phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T, đây cũng là hai hợp chất ô nhiễm chủ yếu trong mẫu đất nghiên cứu.

Trong các công thức xử lý bằng phân hủy sinh học đã có sự thay đổi cơ bản về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn. Trước hết đó là sự xuất hiện của các vi khuẩn kỵ khí *Clostridium*, *Tissierella* và vi khuẩn kỵ khí tùy tiện *Lactobacillus* và *Dysgonomonas mossii*. Trong quá trình xử lý, nước lấy từ ao, hồ ở các vùng lân cận và nguồn carbon là sản phẩm phụ trong công nghiệp mía đường đã được bổ sung vào các thùng xử lý và đây là nguồn bổ sung có thể đã tạo điều kiện yếm khí và nguồn dinh dưỡng thuận lợi hơn cho các nhóm vi sinh vật kể trên. Hiện nay, nhiều nhóm vi sinh vật kỵ khí khử loại chlor đã được phát hiện (Bunge *et al.*, 2003; Hiraishi *et al.*, 2005). Đặc biệt, hai chủng vi khuẩn *Dehalococcoides* sp. CBDB1 và *Dehalococcoides* sp. 195 có khả năng khử loại chlor của các hợp chất dioxin chứa nhiều chlor thành dioxin với số nguyên tử chlor ít hơn thậm chí đến hợp chất dioxin không có chlor (Bunge *et al.*, 2003; Fennell *et al.*, 2004). Gần đây, Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả (2007b) đã phát hiện sự tồn tại của nhóm vi khuẩn này trong công thức tẩy độc “chôn lấp tích cực” 10DNT đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng bằng phân hủy sinh học. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này điều kiện kỵ khí ở các công thức xử lý 0,5 m³ đều không tốt như ở công thức 10DNT, ngoài ra để phát hiện nhóm *Dehalococcoides* cần phải sử dụng kỹ thuật PCR lồng với mỗi đặc hiệu cho nhóm vi sinh vật này.

Bên cạnh sự phát hiện của các chi vi khuẩn kỵ khí kể trên, một số nhóm vi sinh vật khác cũng được tìm thấy ở các công thức xử lý 0,5DN1 đến 0,5DN4. Đáng lưu ý ở đây đó là các vi khuẩn *Pseudomonas* và vi khuẩn *Escherichia* và *Citrobacter*. Do có bổ sung nước từ các ao, hồ lân cận nên vi khuẩn thuộc hai chi *Escherichia* và *Citrobacter* tồn tại sẵn trong nguồn nước này có thể đã đi vào các công thức xử lý. Các đợt lấy mẫu đều phát hiện nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* trong đó có *Pseudomonas stutzeri*. Kết quả ở hình 2, hình 3 cho thấy các dòng có mức tương đồng cao với vi khuẩn *P. stutzeri* phân bố khá phổ biến và trội trong các công thức xử lý. Một số chủng *Pseudomonas* sp. HH69, *P. resinovorans* CA10, *P. fluorescens* TTC1, *P. fluorescens* BS243, *P. aeruginosa*, *P. putida* G7, *P. putida* BS291, *P. putida* PH-01, *Pseudomonas* sp. F274, *P. stutzeri* OM1, *P. stutzeri* ATCC 31258 và *P. veronii* PH-0 có khả năng chuyển hóa dibenzofuran, dioxin và các hợp chất tương tự (Ishiguto *et al.*, 2000; Hiraishi, 2003). Sự tồn tại của các dòng *Pseudomonas stutzeri* cho thấy quá trình xử lý đã tạo điều kiện thuận lợi cho sinh

trường của các vi khuẩn này. Tuy nhiên, để đánh giá vai trò của nhóm vi khuẩn này cũng như các nhóm vi khuẩn khác trong quá trình làm sạch chất ô nhiễm cần có các nghiên cứu sâu hơn.

Bảng 1. Mối quan hệ giữa một số dòng đại diện tách từ gel SSCP và các vi khuẩn đã công bố.

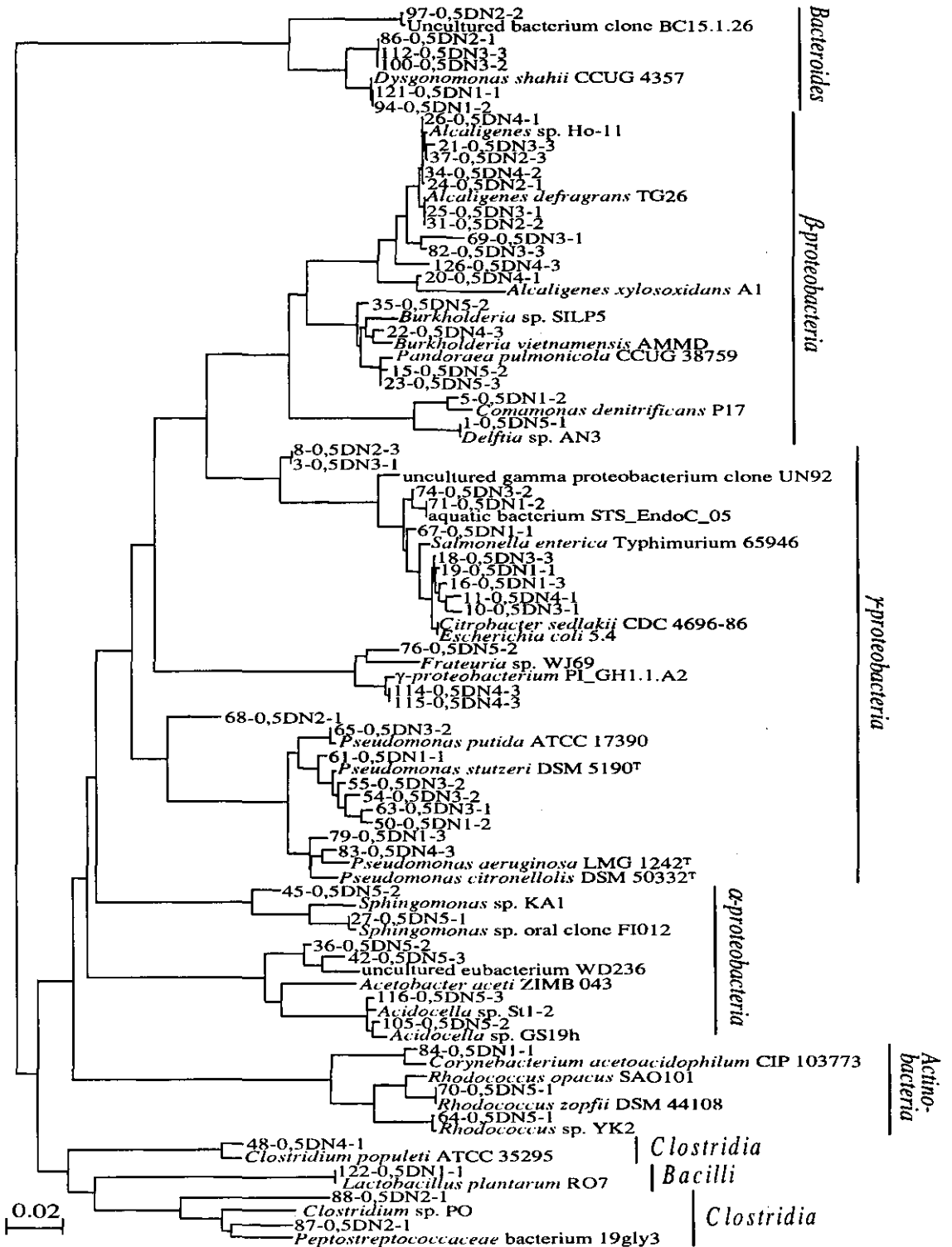
Dòng	Số đăng ký GenBank	Mối quan hệ với các vi khuẩn đại diện		
		Lớp	Vi khuẩn gần gũi nhất	% tương đồng
1-0,5DN5-1	EF016387	Beta-proteobacteria	<i>Delftia acidovorans</i> MBIC13502	100
5-0,5DN1-2	EF016389		<i>Comamonas denitrificans</i> 123 ^T	95,9
15-0,5DN5-2	EF016393		Uncultured <i>Burkholderia</i> bacterium 015B-A07	96,4
20-0,5DN4-1	EF016397		<i>Kerstersia</i> sp. LMG 5890	91,6
22-0,5DN4-3	EF016399		<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17616	98,2
21-0,5DN3-3	EF016398		<i>Alcaligenes</i> sp. Ho-11	96,4
24-0,5DN2-1	EF016401		<i>Alcaligenes</i> sp. Ho-11	100
25-0,5DN3-1	EF016402		<i>Alcaligenes defragrans</i> N1	100
26-0,5DN4-1	EF016403		<i>Alcaligenes</i> sp. Ho-11	99,2
31-0,5DN2-2	EF016405		<i>Alcaligenes defragrans</i> TJ4	100
34-0,5DN4-2	EF016405		<i>Alcaligenes</i> sp. Ho-11	100
69-0,5DN3-1	EF016422		<i>Alcaligenes</i> sp. NKNTAU	91,0
82-0,5DN3-3	EF016428		Uncultured beta proteobacterium Blrii6	96,2
126-0,5DN4-3	EF016444		<i>Alcaligenes</i> sp. Ho-11	89,5
3-0,5DN3-1	EF016388		Gamma-proteobacteria	<i>Citrobacter amalonaticus</i> CDC 9020-77
8-0,5DN2-3	EF016390	Uncultured gamma proteobacterium UN92		88,6
10-0,5DN3-1	EF016391	<i>Citrobacter sedlakii</i> CDC 4696-86 ^T		98,6
11-0,5DN4-1	EF016392	<i>Escherichia coli</i> 5.4		99,0
16-0,5DN1-3	EF016394	<i>Citrobacter sedlakii</i> CDC 4696-86 ^T		99,0
18-0,5DN3-3	EF016395	<i>Citrobacter sedlakii</i> CDC 4696-86 ^T		99,0
19-0,5DN1-1	EF016396	<i>Citrobacter sedlakii</i> CDC 4696-86 ^T		99,0
67-0,5DN1-1	EF016420	Aquatic <i>Citrobacter</i> bacterium STS_EndoC_05		94,3
71-0,5DN1-2	EF016424	Aquatic <i>Citrobacter</i> bacterium STS_EndoC_05		100
74-0,5DN3-2	EF016425	<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039 ^T		95,2
68-0,5DN2-1	EF016421	Uncultured gamma proteobacterium ZA3235c		98,1
50-0,5DN1-2	EF016413	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 ^T		97,9
54-0,5DN3-2	EF016414	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17685		98,5
55-0,5DN3-2	EF016415	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 27951		98,5
61-0,5DN1-1	EF016416	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 24a36		93,1
63-0,5DN3-1	EF016417	<i>Pseudomonas stutzeri</i> API-2-142		97,7
65-0,5DN3-2	EF016419	Aquatic <i>Pseudomonas</i> bacterium STS_R2A_04		98,7
83-0,5DN4-3	EF016429	Uncultured <i>Pseudomonas</i> bacterium B1		95,6
79-0,5DN1-3	EF016427	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 ^T	92,2	
76-0,5DN5-2	EF016426	Arsenic resistant <i>Frateuria</i> soil bacterium 7-03	91,5	

114-0,5DN4-3	EF016439		<i>Gamma proteobacterium</i> PI_GH1.1.A2	96,9
115-0,5DN4-3	EF016440		<i>Gamma proteobacterium</i> PI_GH1.1.A2	96,9
86-0,5DN2-1	EF016431	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Dysgonomonas mossii</i> CCUG 43457 ^T	89,2
94-0,5DN1-2	EF016434		<i>Dysgonomonas mossii</i> CCUG 43457 ^T	100
97-0,5DN2-2	EF016435		Uncultured <i>Dysgonomonas</i> bacterium BC15.1.26	98,4
121-0,5DN1-1	EF016442		<i>Dysgonomonas mossii</i> CCUG 43457 ^T	100
100-0,5DN3-2	EF016436		<i>Dysgonomonas mossii</i> CCUG 43457 ^T	89,2
112-0,5DN3-3	EF016438		<i>Dysgonomonas mossii</i> CCUG 43457 ^T	89,2
27-0,5DN5-1	EF016404	<i>Alpha-</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. oral chlome F1012	98,2
45-0,5DN5-2	EF016411	<i>proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31961	85,5
36-0,5DN5-2	EF016408		Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> BPM3_C07	89,9
105-0,5DN5-2	EF016437		<i>Acidocella</i> sp. St1-2	95,4
116-0,5DN5-3	EF016441		<i>Acidocella</i> sp. IS10	96,9
48-0,5DN4-1	EF016412	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium populeti</i> ATCC 35295 ^T	90,4
87-0,5DN2-1	EF016432		Uncultured <i>Tissierella</i> bacterium BSA1B-10	81,1
88-0,5DN2-1	EF016433		<i>Tissierella</i> sp. Kre4 ^T	78,3
64-0,5DN5-1	EF016418	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. YK2	100
70-0,5DN5-1	EF016423		<i>Rhodococcus rhodochrous</i> 11Y	100
84-0,5DN1-1	EF016430		<i>Corynebacterium glutamicum</i> DSM20300 ^T	93,3
122-0,5DN1-1	EF016443	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667 ^T	100

Trong tất cả các công thức xử lý và ở cả công thức đối chứng đều thấy sự hiện diện của các băng DNA trội và có quan hệ gần với các vi khuẩn thuộc các chi *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Kerstersia*, *Delftia* trong lớp *Betaproteobacteria*. Các vi khuẩn thuộc các chi này cũng là những nhóm chiếm ưu thế trong các mẫu đất thu thập tại các vị trí khác nhau ở bãi nhiễm này (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2007b). Nhiều vi khuẩn thuộc lớp này có khả năng sử dụng 2,4-D, 2,4,5-T, dioxin và các hợp chất tương tự (Hiraishi, 2003; Itoh *et al.*, 2004; Coenye *et al.*, 2004). Kết quả trong nghiên cứu này cũng phù hợp với một số phát hiện của các tác giả khác về đa dạng vi sinh vật trong đất nhiễm chất diệt cỏ và PCB (polychlorinated biphenyl-dạng hợp chất có cấu trúc tương tự dioxin). Nghiên cứu của Rice và đồng tác giả (2005) cho thấy, các tác động chọn lọc tự nhiên của vi khuẩn sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T trong đất nhiễm chất da cam ở căn cứ quân sự ở Florida (Mỹ). Vi khuẩn sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T phân lập được có quan hệ cao với các loài của chi *Burkholderia*. Công bố của Tiedje và đồng tác giả (1999) cũng cho thấy các chủng vi khuẩn chiếm ưu thế trong đất có sử dụng 2,4-D

thuộc về chi *Burkholderia*. Nogales và đồng tác giả khi đánh giá đa dạng vi sinh vật trong đất nhiễm PCB đã phát hiện vi khuẩn chi *Burkholderia* chiếm ưu thế trong tập đoàn vi sinh vật (Nogales *et al.*, 2001).

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy các công thức xử lý 0,5DN2 và 0,5DN3 có mức độ đa dạng vi khuẩn hơn cả. Do một số lý do nên chỉ hai công thức 0,5DN2 và 0,5DN5 đã được phân tích tổng độ độc dioxin (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Tổng độ độc ban đầu trong công thức đối chứng 0,5DN5 là 72.600 pg TEQ/g. Sau 14 tháng xử lý ở đợt lấy mẫu lần hai độ độc phân tích được trong công thức 0,5DN2 là 64.400 pg TEQ/g. Trung bình mỗi tháng khoảng 585,5 pg TEQ/g độ độc đã bị tập đoàn vi sinh vật sử dụng trong công thức xử lý này. So với công bố của Kao và đồng tác giả thì hiệu quả của tập đoàn vi sinh vật trong công thức 0,5DN2 cao gấp 19 lần (Kao *et al.*, 2001). Haraishi và đồng tác giả (2001) công bố hiệu quả khử độc 2,65 - 365,2 pg TEQ/g/tháng, như vậy hiệu quả khử độc của phương pháp phân hủy sinh học, cụ thể ở công thức 0,5DN2 đã đạt hiệu quả rất tốt.



Hình 3. Cây phát sinh loài của một số dòng tách từ gel SSCP các công thức xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng ở quy mô 0,5 m³ và các chủng vi khuẩn đại diện trên GenBank. Thước đo phản ánh sự sai khác của 2 nucleotide trên 100 nucleotide so sánh.

KẾT LUẬN

Đã khảo sát được sự biến động cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong các công thức xử lý tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở căn cứ quân sự cũ của Mỹ tại sân bay Đà Nẵng. Cấu trúc tập đoàn vi khuẩn không biến động nhiều giữa ba lần lấy mẫu ở công thức đối chứng không xử lý 0,5DN5. Tuy nhiên, các công thức xử lý 0,5DN1 đến 0,5DN4 có sự đa dạng hơn về các tập đoàn vi khuẩn so với công thức đối chứng 0,5DN5. Giữa các công thức xử lý và giữa các đợt lấy mẫu cũng có sự thay đổi về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn. Công thức 0,5DN4 có sự đa dạng vi khuẩn thấp hơn so với các công thức còn lại. Hai công thức 0,5DN2 và 0,5DN3 có sự đa dạng vi khuẩn cao nhất trong các công thức. Kết quả so sánh trình tự 58 dòng tách từ gel SSCP với các trình tự gen 16S rRNA trên GenBank và RDP cho thấy các dòng này thuộc 7 lớp vi khuẩn bao gồm *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Clostridia*, *Actinobacteria*, *Bacteroides* và *Bacilli*. Một số dòng có quan hệ gần gũi với các vi khuẩn kỵ khí *Clostridium*, *Tissierella*, vi khuẩn kỵ khí tùy tiện *Lactobacillus* và *Dysgonomonas mossii*, vi khuẩn *Escherichia* và *Citrobacter* cũng được phát hiện trong các công thức xử lý. Nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* trong đó có *P. stutzeri* và các vi khuẩn thuộc các chi *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Kerstersia*, *Delftia* trong lớp *Betaproteobacteria* chiếm ưu thế trong các công thức xử lý.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bởi kinh phí của đề tài cấp 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, đề tài khoa học cơ bản “Nghiên cứu biến động cấu trúc tập đoàn vi khuẩn hiếu khí trong các công thức xử lý đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng bằng công nghệ phân hủy sinh học” và quỹ học bổng DAAD (Cộng hòa Liên bang Đức).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bunge M, Adrian L, Kraus A, Opel M, Lorenz WG, Andreesen JR, Gorisch H, Lechner U (2003) Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* 241: 357-360.

Coenye T, Henry D, Speert DP, Vandamme P (2004) *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *System Appl Microbiol* 27: 623-627.

Dang TCH, Nguyen BH, Pham TQV, Nguyen TD, Nguyen QV, Nguyen DN, La TP, Tran NH, Mai AT, Pham HL, Nguyen VM, Le VH, Do QH, Dang VM, Nguyen DH (2002) Bioremediation treatment for cleaning up toxic chemical contaminated soil in field trials. *Orgahalog Compd* 56: 433-436.

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) 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. *Báo cáo nghiệm thu đề tài nhà nước thuộc Chương trình 33*. Trung tâm thông tin khoa học và công nghệ Quốc gia. Bộ Khoa học và Công nghệ.

Fennell DE, Nijenhuis I, Wilson S, Zinder S, Haggbom MM (2004) *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environ Sci Technol* 38: 2075-2081.

Haraishi A, Miyakoda H, Lim BR, Fujie HY, Hu K, Suzuki J (2001) Toward the bioremediation of dioxin-polluted soil: structural and functional analyses of *in situ* microbial populations by quinone profiling and culture-dependent method. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 248-256.

Hiraishi A (2003) Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilisation in bioremediation. *Microb Environ* 18: 105-123.

Hiraishi A, Miyakoda H, Murayama T, Kato K, Futamara H (2005) Estimation of “*Dehalococcoides*” population in lake sediment contaminated with low levels of PCDD. *Microb Environ* 20: 216-226.

Ishiguto T, Ohtake Y, Nakayama S, Inamori Y, Amagai T, Soma M, Matsusita H (2000) Biodegradation of dibenzofuran and dioxins by *Pseudomonas aeruginosa* and *Xanthomonas maltophilia*. *Environ Technol* 21: 1309-1316.

Itoh K, Tashiro Y, Uobe K, Kamagata Y, Suyama K, Yamamoto H (2004) Root nodule *Bradyrhizobium* spp. Harbor *tdaA* and *cadA*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Appl Environ Microbiol* 70: 2110-2118.

Kao CM, Chen SC, Liu JK, Wu MJ (2001) Evaluation of TCDD biodegradability under different redox condition. *Chemosphere* 44: 1447-1454.

Keller M, Zengler K (2004) Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol* 2: 141-150.

Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of

soil studying soil microbial diversity. *J Microbiol Meth* 58: 169-188.

Nguyễn Bá Hữu, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2007a) Sử dụng kỹ thuật điện di trên gel chứa dài nồng độ chất biến tính để xác định nhóm vi khuẩn khử loại chlor *Dehalococcoides* trong các công thức xử lý tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(1): 123-132.

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, Dietmar H Pieper (2007b) Xác định cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong đất nhiễm chất độc hóa học dựa trên phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn gen 16S rRNA. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(1): 123-132.

Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R, Timmnis KN (2001) Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 67: 1874-1884.

Rice JF, Menn F-M, Hay AG, Sanseverino J, Sayler GS (2005) Natural selection for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid mineralizing bacteria in agent orange contaminated soil. *Biodegradation* 16: 501-512.

Schwieger F, Tebbe CC (1998) A new approach to utilize PCR- single strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64: 4870-4876.

Stellman JM, Stellman SD, Christian R, Weber TA, Tomassalla C (2003) The extent and patterns of usage of agent orange and the herbicides in Vietnam. *Nature* 422: 681-687.

Syamsul Arif MA, Houwen F, Verstraete W (1996) Agricultural factors affecting methane oxidation in arable soil. *Biol Fertil Soils* 21: 95-102.

Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K, Marsh TL, Flynn SJ (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol* 13: 109-122.

DIVERSITY OF BACTERIA COMMUNITY STRUCTURE DURING DETOXIFICATION PROCESS OF HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL AT FIELD SMALL SCALE

Nguyen Ba Huu¹, Dang Thi Cam Ha^{1,*}, Nong Van Hai¹, Dietmar H. Pieper²

¹Institute of Biotechnology

²Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

SUMMARY

Bioremediation technology is widely used in detoxification treatment of chlorinated organic contaminants due to its cost effectivity and environmental safety. This technology has been applied in detoxification at several different scales of herbicide/dioxin contaminated soil in US former military base at Danang airport. The GC-MS analytical results of residue of dioxin concentration in biotreatment soils showed the significant reduction of the toxicants in the bioremediation at scale 0.5 m³ soil. In previous studies, the change of microbial community structure was usually performed by cultural method. Therefore, that does not reflect the exact phenomena of microbes in different biotreatments. In this study, analysis single strand conformation polymorphism (SSCP) of a part of 16S rRNA gene was used to study the change of bacterial community structure at 0.5 m³ biotreatment scale. There was no significant change on bacterial community structure between the 3 different sampling times in control experiment 0,5DN5. However, the change of bacterial community structure in different sampling times and in different biotreatment experiments was found. Biotreatment experiments also showed more diverse than in the control experiment 0,5DN5. The supply of carbon source derived from sugar-cane refinery to 0,5DN4 biotreatment experiment might cause the decrease of growth in bacterial communities. The suitable supply of carbon sources lead to the increase of bacterial diversity in two other biotreatments 0,5DN2 and 0,5DN3 in comparison to the rest. The DNA clones excised from SSCP gel belonged to 7 classes of α , β and γ -Proteobacteria, Clostridia, Actinobacteria, Bacteroides and Bacilli. Some clones showed a close relationship to anaerobic bacteria such as Clostridia, Tissierella, facultative anaerobic bacteria Lactobacillus and Dysgonomonas mossii. The genera Escherichia and Citrobacter were also found in biotreatment experiments. Bacteria Pseudomonas including Pseudomonas stutzeri and other representative of genera Burkholderia, Alcaligenes, Kersteria, Delftia in Betaproteobacteria were also

* Author for correspondence: Tel: 84-4-8360892; Fax: 84-4-8363144; E-mail: ha@mdp-ibt.ac.vn

dominant in all of biotreatments. Many bacteria of these genera are able to degrade 2,4-D, 2,4,5-T and dioxin. The results in this study provide fundamental bases for scientists and technologists to enhance the rate of detoxification of herbicide/dioxin as well as other toxic chemical contaminated soil in Vietnam.

Keywords: *Bacterial community structure, bioremediation, detoxification, dioxin, herbicide, SSCP, 16S rRNA*