

## ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH PHÂN TỬ ĐỂ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN VÀ SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRONG THÍ NGHIỆM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC

Bùi Thị Kim Anh<sup>1</sup>, Đặng Đình Kim<sup>1</sup>, Akihiko Maruyama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ môi trường, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Khoa học và Công nghệ công nghiệp tiên tiến Tsukuba, Nhật Bản

### TÓM TẮT

Xử lý môi trường bằng phương pháp sinh học là một trong những phương pháp triển vọng làm giảm các chất ô nhiễm độc hại. Để ứng dụng thành công phương pháp này, những thông tin về đa dạng sinh học, số lượng và sự biến động của vi sinh vật (VSV) trong môi trường là hết sức cần thiết. Hiện nay, các thông tin về quá trình hoạt động của VSV trong suốt quá trình xử lý cũng như ảnh hưởng của việc xử lý ô nhiễm dầu bằng phương pháp sinh học đến sự thay đổi của cấu trúc tập đoàn VSV biến ở những vùng biển nhiệt đới và cận nhiệt đới là rất hiếm. Bởi vậy, chúng tôi đã thiết kế thí nghiệm (TN) xử lý ô nhiễm dầu bằng phương pháp sinh học sử dụng nước biển cận nhiệt đới thu hồi từ Vịnh Ishigaki (Nhật Bản) và ứng dụng một số kỹ thuật phân tích sinh học phân tử để quan trắc tập hợp VSV trong các TN xử lý sinh học ô nhiễm dầu. Kết quả chỉ ra rằng, số lượng VSV ở những mẫu có bổ sung dinh dưỡng đã tăng lên một cách nhanh chóng. Số lượng VSV ở mẫu nước biển ban đầu là  $8,1 \times 10^5$  tế bào/ml, sau 14 ngày TN số lượng VSV đã đạt tới  $1 \times 10^9$  và  $1,7 \times 10^9$  tế bào/ml ở các thí nghiệm xử lý sinh học. Nước biển ban đầu sử dụng cho nghiên cứu có đặc điểm là phong phú bởi nhóm *ε-proteobacteria*. Trong quá trình TN, tập hợp VSV đã biến đổi từ nhóm *ε-proteobacteria* thành nhóm *γ-proteobacteria*. Trong nhóm *γ-proteobacteria*, loài phân hủy hydrocarbon (HC) no *Alcanivorax borkumensis* chiếm đại đa số trong tập hợp VSV. Đặc biệt ở mẫu (Tetradecane + Biphenyl + Phenanthrene + N + P + Fe + nước biển) tại thời gian TN 10 ngày, chúng chiếm tới 64,5% tổng số VSV. Tuy nhiên, số lượng của loài này không nhiều ở mẫu có bổ sung dầu nặng. Những nghiên cứu sâu hơn là rất cần thiết để phát hiện đại diện của loài phân hủy HC thom trong vùng nước biển cận nhiệt đới này.

*Từ khoá:* Dầu, đa dạng, mẫu dò, nước biển, phân hủy sinh học, phương pháp lai

### MỞ ĐẦU

Nhiều tài liệu đã công bố là đại đa số các vi sinh vật (VSV) trong tự nhiên không có khả năng nuôi cấy (Maruyama *et al.*, 2000; Jang-Cheon Cho *et al.*, 2004). Quan trắc VSV trong môi trường bằng các phương pháp truyền thống như nuôi cấy trên môi trường thạch và quan sát dưới kính hiển vi quang học không giải quyết được những hiểu biết hạn chế của chúng ta về thế giới VSV, chức năng của các loài chiếm ưu thế trong hệ sinh thái tự nhiên. Nếu chỉ dựa vào các kỹ thuật nuôi cấy thông thường, con người chỉ xác định được 0,1 - 1% tổng số VSV trong môi trường tự nhiên. Đặc biệt ở môi trường nước biển, khi sử dụng kính hiển vi huỳnh quang và phương pháp đếm trực tiếp VSV từ mẫu môi trường đã chỉ ra kết quả là 0,01 - 0,1% tổng số VSV là có thể phân lập được (Amann *et al.*, 1995; Jang-Cheon Cho *et al.*, 2004). Nhờ những kỹ thuật phân tích hiện đại, người ta đã khám phá hàng ngàn trình tự gen mới và một số

cấu trúc hoàn toàn mới của thế giới VSV mà không cần phải tiến hành nuôi cấy VSV trong phòng thí nghiệm. Một số phương pháp sử dụng trong nghiên cứu này để quan trắc VSV trong thí nghiệm xử lý ô nhiễm dầu như phân tích cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự đoạn gen 16S rRNA; đếm trực tiếp tế bào VSV từ môi trường (DC); phương pháp lai nhỏ giọt bằng huỳnh quang (FBDH) và phương pháp lai tại chỗ bằng huỳnh quang (FISH) để xác định loài hoặc nhóm VSV cần quan tâm trong mẫu nghiên cứu. Công nghệ phân hủy sinh học làm sạch ô nhiễm dầu mỏ đang được xem như là phương pháp kinh tế, hiệu quả và an toàn đối với môi trường. Công nghệ này hoạt động có hiệu quả hay không phụ thuộc rất lớn vào khả năng phân hủy dầu của VSV bản địa (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2003). Trong rất nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng, khi bổ sung một lượng dinh dưỡng nhất định có thể tăng cường khả năng loại bỏ dầu ở các điểm ô nhiễm bằng VSV bản địa. Ở nghiên cứu này, chúng tôi đi

sâu vào quá trình hoạt động của tập đoàn VSV trong quá trình xử lý ô nhiễm dầu. Các kết quả thu được sẽ là bằng chứng khoa học về sự đa dạng sinh học, sự thay đổi về thành phần và số lượng VSV bản địa trong quá trình phân hủy sinh học HC dầu mỏ.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Nước biển sử dụng cho nghiên cứu này được lấy từ Vịnh Ishigaki (Nhật Bản) vào tháng 11/2005. Vị trí lấy mẫu ở độ sâu khoảng 1 m so với mực nước biển. Hóa chất đã sử dụng có độ tinh khiết cao, được mua của các hãng Sigma (Mỹ), Merck và Rhodé (Đức). Các mẫu dò VSV được lấy từ phòng thí nghiệm của Viện AIST (Nhật Bản).

### Phương pháp

#### Mẫu và cách bố trí thí nghiệm

Chúng tôi bổ sung dầu vào nước biển thí nghiệm để giả định như có hiện tượng ô nhiễm dầu xuất hiện ở Vịnh Ishigaki. Trong thí nghiệm xử lý dầu, dinh dưỡng (N, P) và Fe được khử trùng trước khi bổ sung vào nước biển để kích thích khả năng phân hủy dầu của các VSV bản địa. Các thí nghiệm đều có thể tích là 200 ml nước biển, nhiệt độ ủ là 20°C. Tổng số 4 thí nghiệm đã được thiết lập như sau:

**Thí nghiệm 1a(TN 1a):** Dầu nặng (CHO) + nước biển (SW).

**Thí nghiệm 1b(TN 1b):** CHO + SW + Nitrate (N) + Phosphate (P) + Fe.

**Thí nghiệm 2a(TN 2a):** Tetradecane (TD) + Biphenyl (BP) + Phenanthrene (PHE) + SW.

**Thí nghiệm 2b(TN 2b):** TD + BP + PHE + SW + N + P + Fe.

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  (N),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (P) và Ferric citrate (Fe) đã được bổ sung vào nước biển với nồng độ 1 mg L<sup>-1</sup>, 0,02 mg L<sup>-1</sup> và 0,02 mg L<sup>-1</sup>, tương ứng. Sau khi khử trùng dầu cùng với các vật liệu hữu cơ và màng lọc, chúng tôi đã bổ sung TD, BP, PHE và CHO vào thí nghiệm như là nguồn hydrocarbon với nồng độ cụ thể là TD: 5 mg L<sup>-1</sup>, BP: 1 mg L<sup>-1</sup>, PHE: 1 mg L<sup>-1</sup> và CHO: 5 g L<sup>-1</sup>. Tỷ lệ giữa hàm lượng C:N:P thiết lập trong thí nghiệm đã được nghiên cứu và kế thừa từ những nghiên cứu trước đây (Maruyama *et al.*, 2003). Để đếm trực tiếp tế bào VSV, mẫu được cố định bằng formaldehyde ở nồng độ 4% và được cất giữ trong tủ lạnh 4°C.

### Phương pháp đếm trực tiếp tế bào vi sinh vật

Sử dụng một chất nhuộm màu huỳnh quang DNA đặc biệt là 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). DAPI nhuộm DNA bên trong tế bào, từ đó ta có thể đếm tế bào một cách chính xác. Từ mẫu ban đầu, cố định mẫu bằng formaldehyde 5% để qua đêm ở 4°C, nhuộm mẫu cùng với 40 µl dung dịch DAPI (5 µg/ml), đợi khoảng 10 phút, thêm 10 µl antifade Kit, sử dụng kính hiển vi huỳnh quang để đếm tế bào VSV, mỗi một ô đếm sao cho lượng tế bào nằm trong khoảng 20 - 80 tế bào, chỉ đếm những tế bào bắt huỳnh quang màu xanh. Cách tính số lượng tế bào theo phương pháp của Maruyama và đồng tác giả (2000; 2003).

### Phân tích cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự đoạn gen 16S rRNA

Phân tích cây phát sinh chủng loại chi tiết dựa vào phương pháp của Maruyama và đồng tác giả (2000). Một cách ngắn gọn khi thực hiện phương pháp này đó là, DNA tổng số đã được tách chiết theo phương pháp chuẩn dùng phenol, chloroform, SDS, isoamyl alcohol, ... Sử dụng cặp mồi 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') và 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3') để nhân đoạn DNA (khoảng 1450 bp). Tinh sạch sản phẩm PCR bằng Micro spin S-4000 (Amershan) và tách dòng đoạn gen 16S rRNA theo TA cloning kit (Invitrogen, San Diego, CA) bao gồm 2 bước là gắn và biến nạp. Sau quá trình biến nạp, chọn lọc 20 khuẩn lạc màu trắng trên môi trường LB, cho mỗi khuẩn lạc được chọn phát triển qua đêm trong 2 - 5 ml môi trường LB chứa 100 µg/ml ampicillin. Phân hủy tế bào và làm sạch DNA của 20 clone bằng GFX Micro Plasmid Kit. Kiểm tra kết quả của những clone bằng PCR và điện di trên gel agarose. Trình tự gen được đọc và phân tích tại Viện Nghiên cứu về chức năng và tài nguyên sinh vật, AIST, Nhật Bản. Gửi các trình tự gen thu được lên DDBJ để tìm được loài có liên hệ họ hàng gần nhất. Sau khi lập được danh sách các loài đó, dùng chương trình Clustal W. để phân tích cây phân loại gen. Phân tích liên hệ họ hàng theo chương trình của Maruyama và đồng tác giả (2000) và phần mềm PHYLIP (Felsenstein, 1995).

### Các phương pháp xác định số lượng nhóm hoặc loài VSV

FISH là một kỹ thuật xác định số lượng loài hoặc nhóm VSV dựa vào mẫu dò DNA đặc hiệu (Amann *et al.*, 1995; Maruyama *et al.*, 2003). Mẫu

xác định được cố định bằng formaldehyde nồng độ 3% và để qua đêm ở 4°C. Sử dụng màng lọc poly-L-Lysine có kích cỡ 0,2 µm để lọc mẫu, pha loãng mẫu ở các nồng độ khác nhau sao cho mật độ tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi cực đại là 80 tế bào trong một khoang đếm, bổ sung ethanol (50, 80, 100%) trong 3 phút, cho vào màng lọc mẫu dung dịch lai (5X SSC, 5X Denhardt, 40% formamide, 0,5% SDS) và các mẫu dò (Euba 338 và Albo222), lai trong 4,5 h ở 44°C. Màng lọc được rửa trong một ống 50 ml dung dịch rửa (NaCl 0,9 M; 0,1% SDS; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM [pH 7]) và rửa ở 44°C trong 30 phút trên máy lắc (HB; Taitec, Koshigaya, Nhật Bản). Sau đó, rửa màng lọc một lần nữa bằng nước cất vô trùng trong 15 phút tại nhiệt độ phòng, Nhuộm màu bằng DAPI và xác định như phương pháp DC.

FDBH cũng là một kỹ thuật phù hợp để xác định số lượng loài hoặc nhóm VSV cần tìm dựa trên mẫu dò và tổng số DNA hay RNA thu được sau khi lai. Tổng số DNA và RNA đã được tách chiết từ mẫu ban đầu như trên đã mô tả; chuẩn bị màng nylon (kích cỡ 9 × 12 cm, Bio-Rad, Tokyo, Nhật Bản) cho vào dụng cụ lai để tạo thành các khe khí cho mẫu vào; chuẩn bị mẫu đối chứng đã biết trước như *Escherichia coli* DSM 30083, *Alteromonas*, *Arcobacter*, *Cycloclasticus pugetii* ATCC 51542, *Alcanivorax borkumensis* DSM 11573. Cho 50 µl TE vào mỗi một khe (mỗi mẫu lặp lại 3 lần, đường kính của khe khoảng 3 mm) và bổ sung mẫu cần lai vào (pha loãng mẫu bằng dung dịch TE). Đánh vị trí của mẫu trên màng lai ra tờ giấy minh họa để ghi nhớ khi tổng hợp kết quả. Sau khi cho mẫu vào, cho màng lai vào máy hút để làm khô mẫu. Đặt màng lai vào hộp nhựa có chứa khoảng 20 ml dung dịch lai và lai ở máy lắc nhẹ trong 30 phút ở 35°C. Bổ sung 5 µl

dung dịch mẫu dò và 1 ml dung dịch lai, lai qua đêm ở 35°C. Cho màng lai vào 50 ml dung dịch đệm rửa (1 × SSC, 1% SDS), lai 30 phút, lặp lại 2 lần ở 44°C. Nhiệt độ nước trong suốt quá trình lai và rửa được kiểm soát một cách chặt chẽ bằng máy lắc đa năng HB (Taitec, Koshigaya, Nhật Bản). Màng lai được cho vào hộp đựng 10 ml dung dịch đệm rửa và lắc ở máy lắc trong 5 phút. Cho màng lai vào giấy nylon, bơm vào dưới lớp màng 20 ml dung dịch phát hiện, đợi 2 - 5 phút, sau đó bổ sung vào 10 µl CDP-star và 1 ml dung dịch phát hiện. Xác định hình ảnh thu được trên máy scanner (Molecular Image FX; Bio-Rad). Tính toán phần trăm của các loài hoặc nhóm VSV thu được theo phương pháp tính của Maruyama và đồng tác giả (2003).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Sự thay đổi của số lượng VSV trong thí nghiệm xử lý ô nhiễm dầu

Tổng số tế bào VSV đã được xác định bằng phương pháp nhuộm màu DAPI. Tại thời điểm ban đầu, nước biển lấy từ vịnh Ishigaki có tổng số VSV là  $8,1 \times 10^5$  tế bào. Trong quá trình thí nghiệm, số lượng tế bào đã có những biến đổi rất rõ rệt giữa mẫu có bổ sung và mẫu không bổ sung dinh dưỡng. Ở mẫu TN 10 ngày, số lượng vi sinh vật đã tăng lên  $3 \times 10^8$  tế bào/ml ở TN 1b và  $9 \times 10^8$  tế bào/ml ở TN 2b. Tại thời điểm thí nghiệm là 14 ngày, số lượng tế bào đã lên tới  $1 \times 10^9$  TB/ml ở TN 1b và  $1,7 \times 10^9$  tế bào/ml ở TN 2b. (Bảng 1). Với mẫu không bổ sung dinh dưỡng, không có sự tăng đáng kể số lượng tế bào VSV trong suốt 10 ngày thí nghiệm, do không có đủ lượng N và P để cấu tạo nên tế bào mới.

Bảng 1.

Mẫu TN (TB/ml)	1a	1b	2a	2b
Thời gian TN				
0 ngày	$8,1 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$
10 ngày	$8,69 \times 10^5$	$3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$9 \times 10^8$
14 ngày	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^9$	$5,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^9$

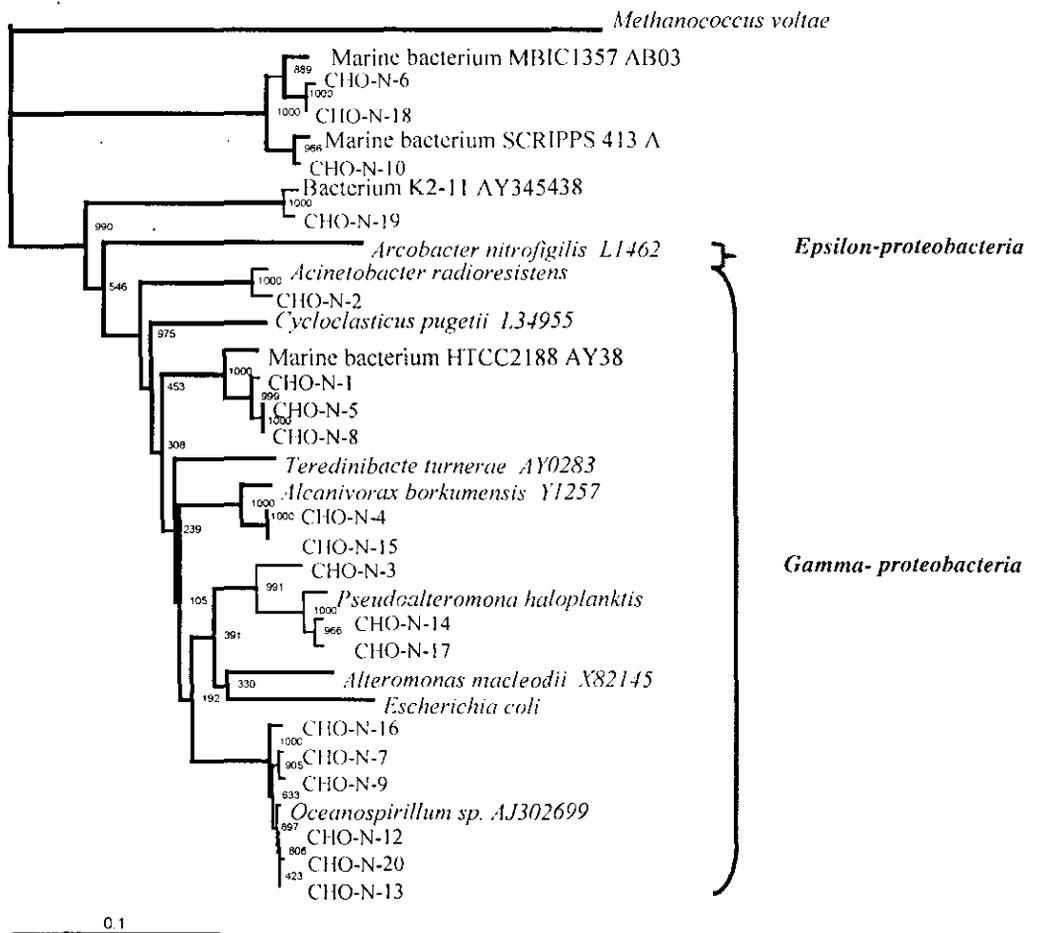
Tổng số tế bào VSV tăng lên đột ngột khi được bổ sung dinh dưỡng (nitrogen và phosphorus) sau khi bổ sung dầu (nguồn carbon). Điều này trùng hợp với một số nghiên cứu trước đây là khi bổ sung một tỷ lệ C:N:P hợp lý sẽ làm tăng số lượng các loài VSV phân hủy nguồn carbon này (Maruyama *et al.*, 2003).

### Sự thay đổi về thành phần VSV trong thí nghiệm

Chúng tôi đã tách chiết được DNA tổng số có chất lượng cao từ mẫu nước biển Ishigaki và thu được sản phẩm PCR từ khuôn. Sau khi làm sạch sản phẩm PCR đặc hiệu, chúng tôi đã gắn sản phẩm PCR vào

vector pCR<sup>®</sup> 2.1 nhờ enzyme T<sub>4</sub> ligase. Hai mươi dòng chứa đoạn gen 16S rRNA của nước biển nghiên cứu đã được tách chiết và kiểm tra. Sau khi so sánh trình tự đoạn gen của các dòng, chúng tôi đã tìm được loài có liên hệ họ hàng gần nhất và đã thiết lập được cây phát sinh chủng loại gen trình bày trên hình 1. Cây phân loại họ hàng đã được đánh giá bởi phân tích hoàn thiện (bootstrap) dựa trên 100 phép tính lặp lại. Kết quả thu được cho thấy, nước biển ban đầu sử dụng trong nghiên cứu này có đặc điểm rất phong phú bởi loài *Arcobacter* spp. thuộc nhóm  $\epsilon$ -*proteobacteria*, chiếm tới hơn 60% trong tổng số 20 dòng đã được đọc trình tự. Đây là nhóm đã được biết đến rất phổ biến

trong trầm tích biển (Maruyama *et al.*, 1997). Sự phong phú của loài *Arcobacter* trong nước biển bề mặt có thể do nước biển ở nền đáy và bề mặt đã có sự đảo trộn tại vịnh Ishigaki ở thời điểm lấy mẫu. Điều này phù hợp vì vị trí lấy mẫu của chúng tôi ở độ sâu khoảng 1 m so với mặt nước biển, tại thời điểm lấy mẫu để phân tích có mưa, gió to và sóng rất mạnh. Trong quá trình nuôi cấy, sự xuất hiện của các nhóm VSV chiếm ưu thế rất khác nhau (trước TN ưu thế thuộc về nhóm  $\epsilon$ -*proteobacteria*, chỉ sau 10 ngày nuôi cấy nhóm  $\alpha$ - và  $\gamma$ -*proteobacteria* chiếm ưu thế). Nhóm  $\alpha$ - và  $\gamma$ -*proteobacteria* - là những nhóm phổ biến trong nước biển bề mặt.



**Hình 1.** Cây phát sinh chủng loại gen dựa trên những dòng chứa đoạn gen 16S rRNA từ mẫu thí nghiệm 1b (thời gian thí nghiệm 14 ngày).

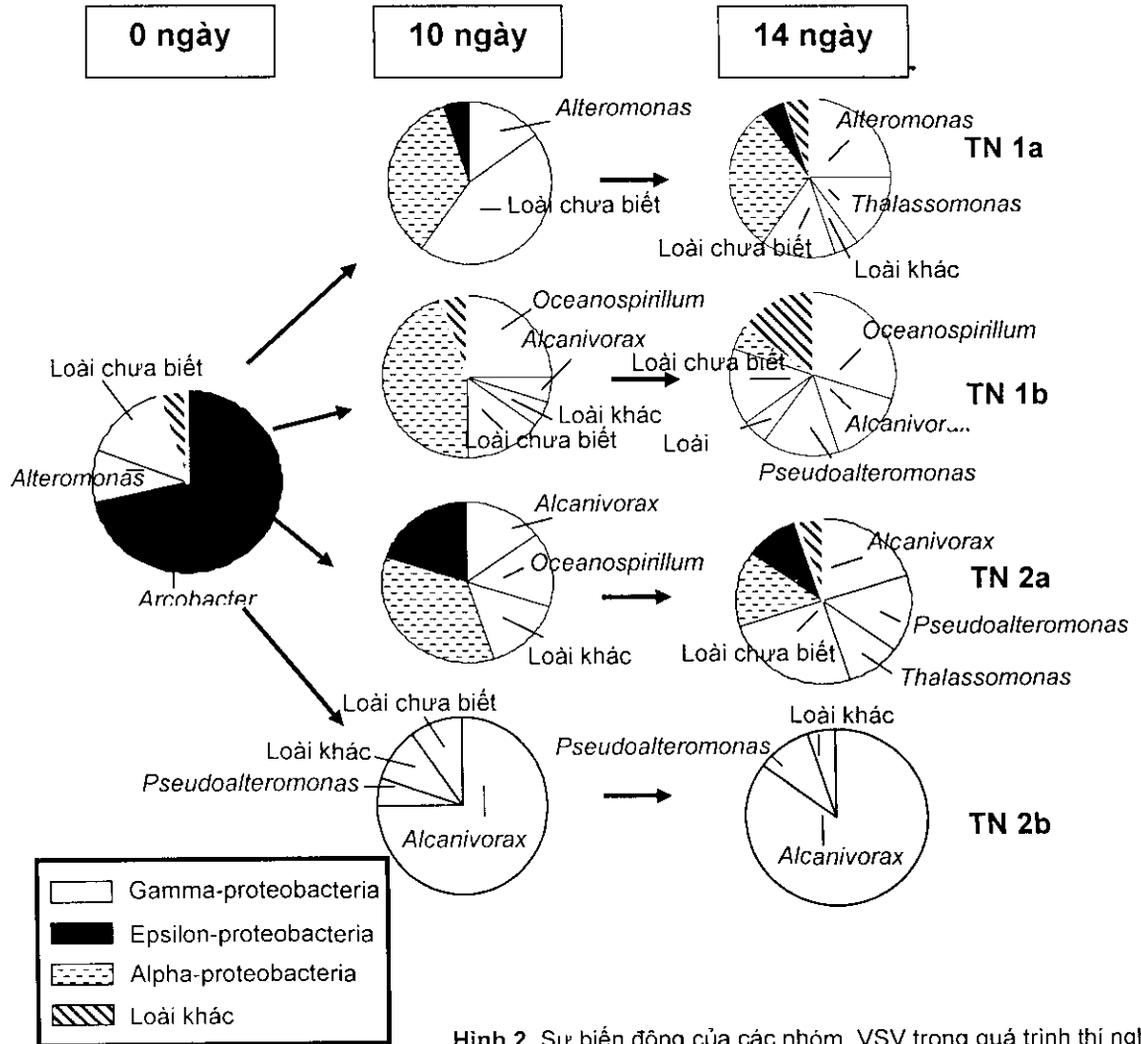
Hai mươi trình tự đoạn gen 16S rRNA của 20 dòng thu được từ nước biển nghiên cứu đã được đăng ký trong ngân hàng gen DDBJ với mã số đăng

ký từ AB262368 - AB262388. Hơn một nửa số trình tự công bố đã được ước đoán từ những loài chưa được biết đến (khi so sánh với các trình tự gen đã

công bố và lưu trữ trên DDBJ thì chúng có hệ số tương đồng với loài có liên hệ họ hàng gần nhất nhỏ hơn < 97%).

Cây phát sinh chủng loại gen từ tất cả các mẫu thí nghiệm đã được phân tích, mỗi một cây phân loại

gen phân tử đều phân tích từ đại diện 20 dòng chứa đoạn 16S rDNA. Hầu hết trình tự của đoạn 16S rDNA đã được so sánh với trình tự sẵn có trong ngân hàng cơ sở dữ liệu gen của Nhật Bản (DDBJ) bằng sử dụng phần mềm FAST. Giá trị bootstrap là 1000 phép tính lặp lại.



Hình 2. Sự biến động của các nhóm VSV trong quá trình thí nghiệm.

Kết quả trên hình số 2 đã thể hiện một cách chi tiết sự biến động của tập hợp VSV trong quá trình thí nghiệm. Đây là hình khái quát kết quả từ 9 cây phát sinh chủng loại của 9 mẫu nghiên cứu. Ngoại trừ mẫu nước biển ban đầu (mẫu TN ở 0 ngày), tất cả các mẫu thí nghiệm ở 10 và 14 ngày đều chứa chủ yếu nhóm  $\gamma$ -proteobacteria, đặc biệt trong mẫu TN2b, tất cả các clones đều thuộc nhóm  $\gamma$ -

proteobacteria và hơn 70% clones có hệ số tương đồng cao nhất với loài *Alcanivorax*. Ở mẫu thí nghiệm xử lý sinh học (TN 1b) với thời gian thí nghiệm là 10 ngày, loài *Oceanospirillum* rất phong phú, chúng chiếm tới 25% trong tổng số 20 clones đọc trình tự. Mẫu TN 1b với thời gian thí nghiệm 14 ngày, khoảng 79% clones là thuộc nhóm  $\gamma$ -Proteobacteria, đặc biệt 30% clones có hệ số tương

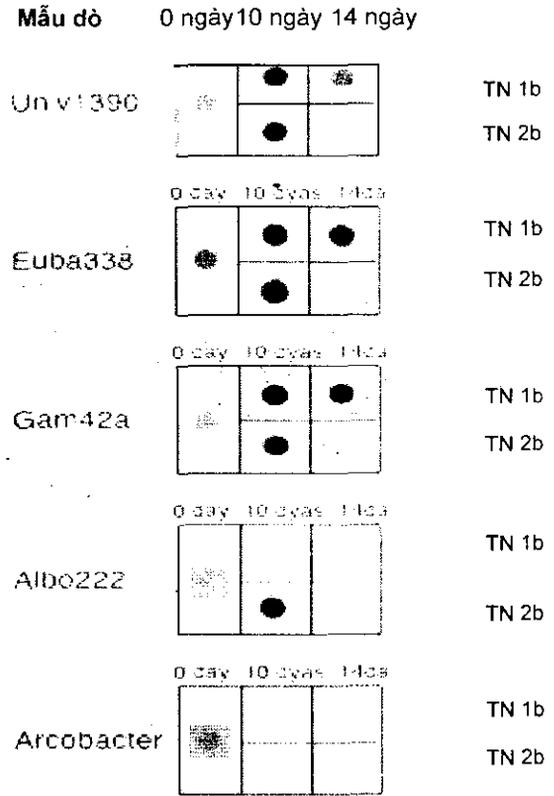
đồng cao nhất với loài *Oceanospirillum* sp. AJ302699 và 15% clones có hệ số tương đồng cao nhất với *Marine bacterium* HTCC2188 AY38. Trong những thí nghiệm này, loài *Cycloclasticus pugetii* đã không được phát hiện như kết quả từ nghiên cứu trước đây (Maruyama et al., 2003). Hy vọng trong tương lai, loài phân hủy hydrocarbon thơm *Cycloclasticus pugetii* sẽ được tìm kiếm ở nước biển cận nhiệt đới này. Với cùng một mẫu nước biển ban đầu, thành phần VSV đã thay đổi rất nhiều giữa các mẫu thí nghiệm khác nhau.

**Đánh giá sự thay đổi của các nhóm và loài VSV điển hình thông qua phương pháp FISH và FBDH**

Các VSV phân hủy HC đã được biết đến là phân bố ở khắp mọi nơi trong môi trường tự nhiên. Tuy nhiên, bình thường mật độ của loài phân hủy HC nhỏ hơn 1% tổng số VSV ở cùng một môi trường (Jang-Cheon Cho et al., 2004). Khi có hiện tượng tràn dầu xuất hiện, các VSV phân hủy HC không phải luôn luôn có đủ số lượng để phân hủy các chất ô nhiễm. Nếu chúng ta áp dụng phương pháp xử lý sinh học, số lượng VSV phân hủy HC được biết là chiếm tới hơn 10% VSV tổng số bằng phương pháp phân lập thông thường (Maruyama et al., 2003). Khi sử dụng các kỹ thuật xác định số lượng ở mức độ phân tử (FBDH), các loài phân hủy HC được ước tính phong phú hơn nhiều so với kết quả thu được từ những phương pháp truyền thống.

Trong phương pháp FBDH, chúng tôi sử dụng một số mẫu dò từ phòng nghiên cứu của TS. A. Maruyama, đó là Univ 1390 (xác định tổng số VSV), Gam42a (xác định  $\gamma$ -*proteobacteria*), Euba338 (xác định vi khuẩn), Arcobacter, Albo222 (xác định loài *Alcanivorax*). Kết quả cho thấy, nhóm  $\gamma$ -*proteobacteria* được phát hiện là rất phong phú trong các mẫu TN 10 và 14 ngày. Cụ thể là,  $\gamma$ -*proteobacteria* được ước tính lên đến 90% tổng số VSV ở mẫu TN 1b, 72% ở mẫu TN 2b (thời gian TN 10 ngày) và 94,9% ở mẫu TN 2b (thời gian TN 14 ngày). Sử dụng mẫu dò Albo 222, chúng tôi đã phát hiện được loài *Alcanivorax borkumensis* và ước tính được phần trăm của chúng trong tổng số VSV ở cùng một mẫu. Trong mẫu TN 2b (thời gian TN 10 ngày) *Alcanivorax borkumensis* đã được ước tính lên tới 64,5% trong tổng số các VSV. Tuy nhiên, cũng ở mẫu TN 2b (thời gian TN 14 ngày) loài này được phát hiện không nhiều. Đây là kết quả phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây (Maruyama et al., 2003; Yakimov et al., 1998). Những mẫu dò mới để ước

tính số lượng của  $\epsilon$ -*proteobacteria* và những loài phân hủy HC thơm trong mẫu là rất cần thiết.



**Hình 3.** Hình ảnh các giọt thu được sau phương pháp phân tích FBDH. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần để phân tích; một hình ảnh hiển thị trên hình là sự tính toán từ sự trùng hợp của 3 hình ảnh lặp lại.

Để chính xác hơn về kết quả thu được của loài *Alcanivorax borkumensis* trong mẫu TN 2b với thời gian TN là 10 ngày từ phương pháp FBDH, chúng tôi đã sử dụng phương pháp FISH để kiểm tra lại kết quả của loài *Alcanivorax borkumensis* trong mẫu trên. Đối với phương pháp này, chúng tôi sử dụng ba mẫu dò là Univ 1390, Euba 338 và Albo 222. Các tín hiệu thu được từ phương pháp nhuộm màu DAPI và các phép lai với 3 mẫu dò Univ 1390, EUB338 và Albo 222 đã được quan sát và đánh giá. Các hình ảnh được phân tích và đánh giá qua phần mềm IP Lab phiên bản 3.1.2 trên máy tính Macintosh G3. Trong phần mềm này, điều khiển kính hiển vi huỳnh quang ở những bước sóng khác nhau chúng tôi sẽ xác định VSV tổng, vi khuẩn và loài *Alcanivorax borkumensis* trong cùng một mẫu và ở cùng một vị

tri. Từ đó, chúng tôi có thể so sánh phần trăm của loài hoặc nhóm VSV cần đánh giá với tổng số VSV. Từ các hình ảnh thu được, chúng tôi đã tính toán và khẳng định ưu thế của loài nổi tiếng phân hủy HC no (*Alcanivorax borkumensis*) trong mẫu thí nghiệm xử lý sinh học này. Loài *Alcanivorax borkumensis* đã chiếm tới 64,5% trong tổng số VSV ở mẫu TN 2b (SW + TD + BP + PHE + N + P + Fe) với thời gian TN là 10 ngày. Kết quả này trùng hợp với kết quả thu được từ phương pháp FBDDH.

## KẾT LUẬN

Hai mươi trình tự đoạn gen 16S rRNA của 20 dòng thu được từ nước biển Ishigaki Nhật Bản đã được đăng ký trong ngân hàng gen DDBJ với mã số đăng ký từ AB262368 - AB262388.

Số lượng VSV ở những mẫu TN xử lý bằng phương pháp sinh học đã tăng lên một cách nhanh chóng. Cụ thể như, lượng tế bào ở mẫu nước biển ban đầu là  $8,1 \times 10^5$  tế bào/ml, sau 14 ngày thí nghiệm số lượng VSV đã đạt tới  $1 \times 10^9$  và  $1,7 \times 10^9$  tế bào/ml ở các TN xử lý sinh học.

Nước biển sử dụng cho nghiên cứu có đặc điểm là phong phú bởi nhóm  $\epsilon$ -proteobacteria - nhóm VSV chiếm ưu thế trong nước biển ban đầu (0 ngày) nhưng đã nhường chỗ cho nhóm  $\gamma$ -proteobacteria sau 10 ngày thí nghiệm. Trong nhóm  $\gamma$ -proteobacteria, loài phân hủy HC no *Alcanivorax borkumensis* chiếm đa số trong tập hợp VSV. Thành phần VSV đã thay đổi rất khác nhau ở các mẫu thí nghiệm.

Mẫu TN 2b (thời gian TN 10 ngày) loài *Alcanivorax borkumensis* chiếm tới 64,5% tổng số VSV. Tuy nhiên, số lượng của loài này đã được phát hiện không nhiều ở mẫu có bổ sung dầu nặng.

**Lời cảm ơn:** Tập thể tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ dự án hợp tác JICA- Nhật Bản cho việc thực hiện nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.

Atlas RM (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* 45: 180-209

Maruyama A, Mita N, Higashihara T (1993) Particulate materials and microbial assemblages around the Izena black smoking vent in the Okinawa Trough. *J Oceanogr* 49: 353-367.

Maruyama A, Taniguchi R, Tanaka H, Ishiwata H, Higashihara T (1997) Low-temperature adaptation of deep-sea bacteria isolated from the Japan Trench. *Mar Biol* 128: 705-711.

Maruyama A, Urabe T, Ishibashi J, Feely RA, Baker ET (1998) Global hydrothermal primary production rate estimated from the southern East Pacific Rise. *Cah Biol Mar* 39: 249-252.

Maruyama A, Sunamura M (2000) Simultaneous direct counting of total and specific microbial cells in seawater, using a deep-sea microbe as a target. *Appl Environ Microbiol* 66:2211-2215.

Maruyama A, Honda D, Yamamoto H, Kitamura K, Higashihara T (2000) Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 835-846.

Maruyama A, Ishiwata H, Kitamura K, Sunamura M, Fujita T, Matsuo M, Higashihara T (2003) Dynamics of Microbial Populations and Strong Selection for *Cycloclasticus pugetii* following the Nakhodka Oil Spill. *Microbial Ecology* 46: 442-453.

Jang-Cheon Cho, Stephen J Giovannoni (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Appl Environ Microbiol*: 432-440.

Nguyễn Bá Hữu, Ivana Schokolovska, Pierre Wattiau, Spiros N Agathos, Đặng Thị Cẩm Hà (2003) Phân hủy sinh học dầu diesel của chủng vi khuẩn *Rhodococcus Rhodochrous* HK-B31 phân lập từ cặn thái xăng dầu. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(2): 245-253.

Prince RC (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit Rev Microbiol* 19: 217-242.

Yakimov MM, Golyshin PN, Lang S, Moore ERB, Abraham WR, Lüsdrof H, Timmis KN (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Sys Bacteriol* 48: 339-348.

## APPLYING MOLECULAR ANALYTICAL TECHNIQUES FOR ASSESSMENT OF MICROORGANISM COMPONENT AND QUANTITY IN DESIGNED OIL POLLUTED EXPERIMENTS BY BIOREMEDIATION

Bui Thi Kim Anh<sup>1,\*</sup>, Dang Dinh Kim<sup>1</sup>, Akihiko Maruyama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Environmental Technology, Vietnamese Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*National Institute of Advance Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan*

### SUMMARY

Bioremediation is one of the promising methods to reduce or eliminate toxic pollutants. For making successful application of this method, information about the diversity, population size and activity of environmental microbes is essential. The previous studies have revealed that biostimulation treatment (nutrient addition) can accelerate oil removal from the polluted sites. But that is not always, since little is known about microbiological processes during the biostimulation. Also, it is uncertain how oil pollution and its bioremediation affect marine microbes in the tropical and subtropical regions. So, we designed bioremediation experiments of oil pollution using subtropical seawater collected from the Ishigaki port in November, 2005. Four incubation sets were prepared: C-heavyoil + seawater (CHO + SW), CH + SW + Nitrate(N) + Phosphate(P) + Fe, Tetradecane(TD) + Biphenyl(BP) + Phenanthrene(PHE) + SW, and TD + BP + PHE + SW + N + P + Fe. Total microbial population, microbial diversity and quantitative community changes were monitored by direct counting, 16S rRNA gene sequencing and fluorescence dot blot hybridization methods, respectively. The obtained results showed that the microbial growth was remarkably enhanced by the addition of nutrients, 345 and 750 times as much as the non-addition. The seawater sample used was characterized by the abundance of *ε-proteobacteria*. During the incubation, the community composition dramatically shifted from *ε-proteobacteria* to *γ-proteobacteria*. Among *γ-proteobacteria*, the aliphatic HC degrader *Alcanivorax borkumensis* increased. Especially, *Alcanivorax borkumensis* was estimated to be 64.5% of total microbes in set 2b at 10<sup>th</sup> incubation day. Comparing to the TD-added sample, however, the population was not so notable in CHO-added one. Further studies are necessary to detect representative aromatic HC degraders.

**Keywords:** *Biostimulation, diversity, marine, microbe, hybridization, probes*

---

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-7910365; Fax: 84-4-7911203; E-mail: buianh78@yahoo.com