

XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG VI NẤM TRONG ĐẤT NHIỄM CHẤT ĐỘC HÓA HỌC TẠI ĐÀ NẴNG DỰA TRÊN PHÂN TÍCH ĐA HÌNH CẤU TRÚC SỢI ĐƠN GEN 18S rRNA

Nguyễn Bá Hữu^{1,2}, Đặng Thị Cẩm Hà¹, Nông Văn Hải¹, Dietmar H Pieper²

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

TÓM TẮT

Chiến tranh đã qua hơn 30 năm, nhưng tại một số căn cứ quân sự cũ của Mỹ tại miền Trung và Nam Việt Nam vẫn bị ô nhiễm nặng nề bởi chất độc hóa học (chất diệt cỏ) chứa dioxin. Hiện nay, có một số phương pháp khử độc các “điểm nóng” này trong đó kích thích phân hủy sinh học của vi sinh vật bản địa đang được xem như là phương pháp kinh tế nhất và thân thiện với môi trường. Trong các tập đoàn vi sinh vật tham gia quá trình phân hủy sinh học các chất ô nhiễm, nấm đóng vai trò rất quan trọng. Tuy nhiên số lượng nấm nuôi cấy được ở điều kiện phòng thí nghiệm chỉ chiếm từ 5 - 10%. Hiện nay, các kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên nucleic acid, như kỹ thuật phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn (single strand conformation polymorphism - SSCP) đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật nói chung và nấm nói riêng. Trong nghiên cứu này, đa dạng nấm không phụ thuộc nuôi cấy từ 9 mẫu đất thu thập ở các vị trí có nồng độ dioxin khác nhau tại căn cứ quân sự cũ của sân bay Đà Nẵng đã được phân tích so sánh đoạn gen 18S rRNA dựa trên kỹ thuật SSCP. Các mẫu ở rìa bãi nhiễm và ở vị trí có độ ô nhiễm thấp hơn có độ đa dạng vi nấm cao hơn các mẫu ở giữa bãi và có nồng độ chất độc cao. Tập đoàn nấm có quan hệ gần gũi với các chi vi nấm như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum*, *Exophiala*, *Setosphaeria*, *Mycosphaella* v.v. Các chi vi nấm phổ biến trong đất nhiễm chất độc hóa học gồm *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum*.

Từ khóa: Chất diệt cỏ, đa dạng vi sinh vật, nấm, kích thích sinh học, SSCP, 18S rRNA

MỞ ĐẦU

Trong chiến tranh Việt Nam, quân đội Mỹ đã phun, rải khoảng 100 triệu lít thuốc diệt cỏ (Stellman *et al.*, 2003) chứa gần 1080 kg dioxin xuống nhiều vùng ở miền Trung và Nam Việt Nam (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Chiến tranh đã qua đi hơn 40 năm tuy nhiên ảnh hưởng của các chất độc hóa học này vẫn còn nặng nề đối với sức khỏe của các nạn nhân và môi trường. Gần đây một số nghiên cứu của Việt Nam và Quốc tế cho thấy một số “điểm nóng” vẫn bị ô nhiễm nặng các chất độc hóa học này. Đất của sân bay Đà Nẵng, Biên Hòa có độ tồn lưu của PCDD/Fs (polychlorodibenzodioxin/furan), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) khá cao. Trong số các chất trên, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) đã phân tích được ở mức cao, chiếm tới trên 90% tổng độ độc trong các mẫu tại sân bay Đà Nẵng. Hàm lượng 2,4,5-T, 2,4-D có mẫu lên tới hàng vài trăm nghìn đến vài triệu µg/kg

đất (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Như vậy, một câu hỏi được đặt ra đó là dưới tác động của các chất ô nhiễm kể trên cộng đồng vi sinh vật sẽ được lựa chọn, thích nghi ra sao? Giải quyết được câu hỏi này cũng là cơ sở khoa học cho các nhà vi sinh vật học và công nghệ khi đưa ra biện pháp hiệu quả khử độc chất ô nhiễm bằng phân hủy sinh học. Trong số các vi sinh vật, nấm đóng vai trò rất quan trọng đối với quá trình phân hủy các chất ô nhiễm. Nấm có thể hydroxyl hóa trực tiếp các hợp chất ether có hai vòng thơm hoặc thủy phân các hợp chất trung gian epoxide do tác động của enzyme oxy hóa P450 của các cơ thể bậc cao hoặc vi sinh vật tiền nhân khác (Hiraishi, 2003). Tuy nhiên, vi sinh vật nuôi cấy được trong điều kiện phòng thí nghiệm chỉ chiếm khoảng từ 0,01 - 10% tổng số vi sinh vật ở tự nhiên (Keller, Zengler, 2004; Kirk *et al.*, 2004). Hiện nay, nhiều kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phân tích nucleic acid đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật nhằm đưa ra những cái nhìn mới về đa dạng vi sinh vật. Một trong số các kỹ thuật đã và đang được

nhiều nhà nghiên cứu sử dụng đó là kỹ thuật phân tích SSCP của gen 16S rRNA, 18S rRNA và gen mã hóa đoạn đệm giữa các gen rRNA (Schwieger, Tebbe, 1998; Lowell, Klein, 2001). Ban đầu kỹ thuật này được dùng trong các nghiên cứu chẩn đoán để phát hiện các đột biến hoặc sự sai khác allele của các gen trong các cơ thể nhân thật và được dùng nhiều trong nghiên cứu di truyền người (Schwieger, Tebbe, 1998; Kirk *et al.*, 2004). Dưới điều kiện không biến tính các phân tử DNA sợi đơn sẽ cuộn thành dạng có cấu hình quả bóng dựa trên trình tự nucleotide và các yếu tố lý-hóa môi trường (ví dụ nhiệt độ, cường độ ion). Sự cuộn xoắn khác nhau dẫn đến hình dạng cấu trúc khác nhau và di chuyển khác nhau khi điện di và sẽ được phân tách trong điện di trên gel polyacrylamide không biến tính. Do không cần môi gaine GC nên kỹ thuật này không đòi hỏi gradient gel, hoặc các thiết bị đặc biệt. SSCP dường như đơn giản và không phức tạp hơn so với kỹ thuật điện di gel trên dải biến tính bởi hóa chất (DGGE - denature gradient gel electrophoresis) và bởi nhiệt (TGGE - temperature gradient gel electrophoresis). Mục đích của nghiên cứu này đó là ứng dụng kỹ thuật SSCP phân tích đa dạng cấu trúc tập đoàn vi nấm nhằm có thêm hiểu biết về đa dạng vi sinh vật trong tự nhiên nói chung và trong các mẫu đất nhiễm chất độc hóa học.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chín mẫu đất nhiễm chất độc hóa học tại sân bay Đà Nẵng được lấy ở 9 điểm có nồng độ chất độc hóa học khác nhau và được ký hiệu HDN1, HDN2, HDN3, HDN4, HDN5, HDN6, HDN7, HDN8 và HDN9. Mẫu HDN9 được lấy ở vị trí có cỏ mọc và nồng độ chất ô nhiễm thấp hơn. Các mẫu đất được thu thập ở độ sâu từ 5 - 25 cm và 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). Các cặp mồi EF4F (5'- GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG - 3') và Fung5RP (5'- GTA AAA GTC CTG GTT CCC C - 3'); IST1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A -3'), ITS2RP (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3') và IST4RP (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -

3') được dùng để nhân đoạn gen 18S rRNA, đoạn đệm liên gen 18S - 5.8S - 28S rRNA (Anderson, Cairney, 2004). Các mồi ITS2RP, IST4RP và Fung5RP được phosphoryl hóa ở đầu 5'. Hỗn hợp 25 µl phản ứng PCR bao gồm 2,5 µl đệm *Taq* PCR 10x, 0,5 µl dNTPs 12,5 mM, 1,25 µl mỗi mồi xuôi (F) hoặc mồi ngược (RP) 10 µM, 0,2 µl *Taq* polymerase (5 đơn vị/µl), 1 - 5 µl DNA tổng số. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: 94°C - 4 phút; 35 chu kỳ (94°C - 1 phút, 48°C - 55°C - 1 phút, 72°C - 1 phút), 72°C - 8 phút; giữ nhiệt độ ở 4°C sau khi phản ứng kết thúc. Kiểm tra DNA và sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose (0,8 - 2%) và quan sát dưới tia UV.

PCR-SSCP

Sản phẩm PCR được làm sạch bởi kit QIAquick (Qiagen) và tiến hành cắt sợi đơn có mồi IST4RP và Fung5RP bằng enzyme lambda exonuclease ở 37°C trong 3 h. Tiếp tục làm sạch sản phẩm PCR sau khi đã được cắt enzyme lambda exonuclease bằng kit QIAquick và làm khô mẫu DNA trong thiết bị cô chân không. Hòa DNA trong 6 µl chất màu SSCP (10 mM NaOH, 0,25% xylene cyanol [w/v], 0,25% bromophenol blue [w/v], 95% formamide [v/v]) và biến tính DNA ở 94°C trong 3 phút sau đó chuyển ngay lập tức mẫu sang điều kiện lạnh (nước đá). Tiến hành chạy điện di mẫu DNA trên thiết bị Bio-Rad DCode™ được nối với thiết bị làm lạnh Lauda E100 ở 250V (30 mA) trong 18 h, nhiệt độ 20°C, gel MDE0,625X, 20 cm × 20 cm × 0,75 mm và trong đệm TBE1X. Mẫu DNA được nhuộm bạc, cắt và thổi DNA các băng DNA từ gel đã làm khô.

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

Trình tự nucleotide của đoạn gen 18S rRNA được xác định trực tiếp hai chiều xuôi và ngược trên máy xác định trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer với bộ hóa chất sinh chuẩn BigDye Terminator của Perkin - Elmer. Kết quả trình tự nucleotide được xử lý trên phần mềm SeqAssem version 01/2005 và Sequencher version 4.0.5. Mức độ tương đồng của các đoạn gen 18S rRNA trong các mẫu đất được so sánh với các trình tự gen 18S rRNA trên GenBank. Cây phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự gen 18S rRNA được thiết kế dựa trên các phần mềm Clustal X, Bioedit version 6.0.7, Gendoc, Neighbour-Joining Tree. Các trình tự đoạn gen 18S rRNA được đăng ký trên GenBank.

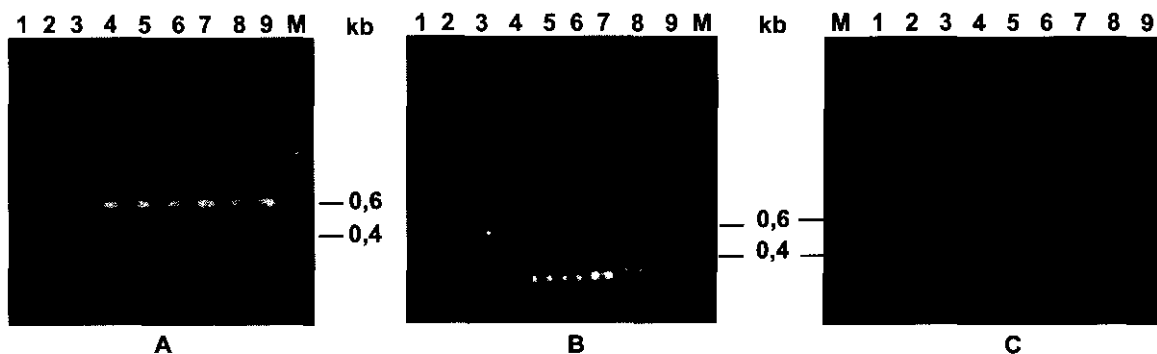
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân đoạn gen 18S rRNA từ các mẫu đất nhiễm chất độc hóa học

DNA được tách chiết từ 0,75 g các mẫu đất theo kit Fast Prep Soil DNA Extraction. Kết quả nhân đoạn gen 18S rRNA từ DNA tổng số của 9 mẫu đất HDN1 đến HDN9 (Hình 1A) cho thấy đều thu được băng DNA có kích thước khoảng 570 bp như tính toán lý thuyết.

Các đoạn rDNA đặc biệt các vùng đệm giữa các gen 18S - 5,8S - 28S rRNA (ITS-internal transcribed spacers) có trình tự khá khác nhau giữa các nhóm nấm và kích thước các đoạn khoảng 600 đến 800 bp

có thể dễ dàng nhân bằng kỹ thuật PCR với các môi đa năng. Hiện nay các đoạn đệm ITS đang được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu phân tích phát sinh loài nấm (Kennedy, Clipson, 2003; Anderson, Cairney, 2004). Các cặp môi ITS1F-ITS2RP và ITS1F-ITS4RP được thiết kế để các đoạn đệm giữa các gen 18S - 5,8S - 28S rRNA có kích thước khoảng 300 bp và 580 bp (Anderson, Cairney, 2004). Kết quả hình 1B và 1C cho thấy sản phẩm PCR không đặc hiệu, tuy nhiên cặp môi ITS1F-ITS4RP cho sản phẩm PCR đặc hiệu hơn so với cặp môi ITS1F-ITS2RP. Sản phẩm PCR khi nhân từ cặp môi EF4F-Fung5RP được sử dụng tiếp để phân tích đa dạng cấu trúc tập đoàn nấm dựa trên kỹ thuật PCR-SSCP.



Hình 1. Sản phẩm PCR: A - đoạn gen 18S rRNA (môi EF4F-Fung5RP); B - đoạn đệm giữa các gen 18S - 5,8S - 28S rRNA (môi ITS1F-ITS2RP); C - đoạn đệm giữa các gen ITS (môi ITS1F-ITS4RP); 1-9: HDN1-9; M: Thang DNA chuẩn 0,2 kb (Promega).

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

Sản phẩm PCR được làm sạch, cắt sợi đơn có môi được gắn gốc phosphate bằng enzyme exonuclease và sau đó phân tách các sợi đơn trên gel như mô tả ở phần phương pháp, kết quả được trình bày ở hình 2.

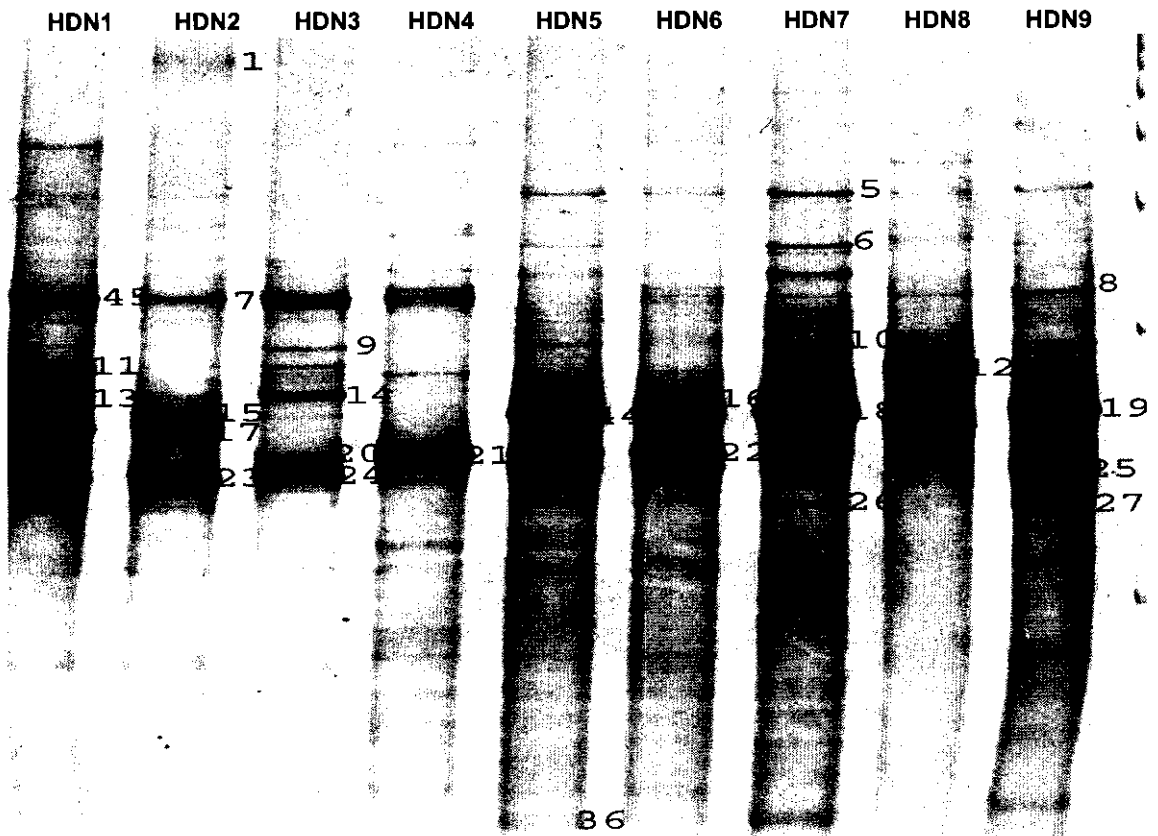
Kết quả phân tích cho thấy mức độ đa dạng khác nhau trong 9 mẫu đất nghiên cứu. Mẫu HDN1, HDN3, HDN7 và HDN9 xuất hiện nhiều băng DNA đậm hơn và có độ đa dạng cao hơn các mẫu khác. Các mẫu còn lại HDN4, HDN5, HDN6 và HDN8 nằm ở gần khu vực giữa bãi nhiễm có nồng độ chất độc hóa học cao hơn và mẫu ở tình trạng khô nên có thể đã ảnh hưởng đến sự phát triển của

các tập đoàn vi sinh vật nói chung và nấm nói riêng. Ba mẫu HDN1, HDN3 và HDN7 nằm phía cuối và rìa của bãi nhiễm nên có thể sự rửa trôi đất và ảnh hưởng của các khu vực đệm đã làm gia tăng sự đa dạng trong các mẫu này. Khác với các mẫu HDN1, HDN3 và HDN7, mẫu HDN9 lấy ở khu vực có cỏ mọc và mức độ ô nhiễm thấp hơn nên cấu trúc tập đoàn nấm có thể phong phú hơn các mẫu khác. Các kết quả trên cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Viện Công nghệ sinh học về phân tích vi sinh vật từ các mẫu đất ô nhiễm Đà Nẵng trên các môi trường nuôi cấy, phân lập (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005).

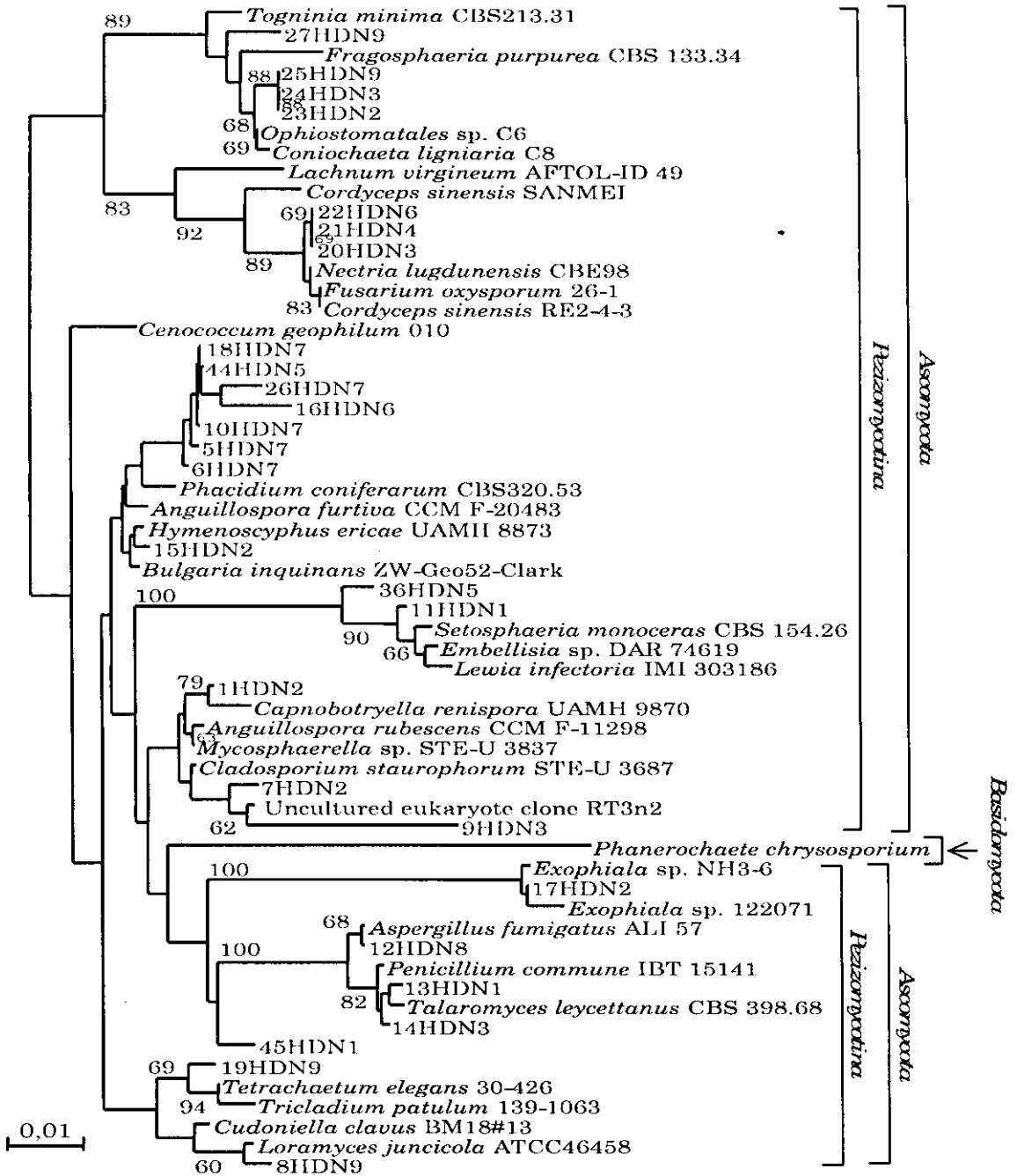
27 dòng tách từ gel SSCP được đọc trình tự và đăng ký trên GenBank với các số đăng ký từ DQ986919 đến DQ986945.

Kết quả xác định 27 dòng đại diện từ gel SSCP cho thấy tập đoàn vi nấm thuộc bộ *Pezizomycotina*, lớp nấm túi *Ascomycota* (Bảng 1, Hình 3). Tập đoàn nấm có quan hệ gần gũi với các chi vi nấm như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Clasdosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum*, *Exophiala*, *Setosphaeria*, *Mycosphaella* ... Các chi nấm trội trong các mẫu đất nhiễm chất độc hóa học gồm *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Clasdosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum*. Nhiều nghiên cứu cho thấy ảnh hưởng của các chất diệt cỏ và thuốc trừ sâu đến tập đoàn vi sinh vật đất. Công bố của Narain Rai cho thấy tập đoàn nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn không có sự sai khác rõ rệt về mức ảnh hưởng của 2,4-D giữa các lần lấy mẫu trong khoảng hơn 10 năm tuy nhiên

các dạng 2,4-D đã có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động của vi sinh vật so với mẫu không bị tác động bởi 2,4-D (Narain Rai, 1992). Chất da cam được quân đội Mỹ sử dụng trong chiến tranh Việt Nam bao gồm hai thành phần chủ yếu 2,4-D và 2,4,5-T và một lượng nhỏ dioxin và các hợp chất tương tự. Nghiên cứu của Rice và đồng tác giả 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) (Rice *et al.*, 2005). Công bố khác về tác động của đất nhiễm chất da cam tại kho tồn chứa ở Mississippi (Mỹ) sau hơn 10 năm cho thấy mặc dù tập đoàn vi sinh vật đã tăng gấp đôi nhưng đa dạng các loài nấm lại giảm đi. Các loài nấm phổ biến và có liên hệ với quá trình trao đổi chất trong đất nhiễm này thuộc các chi *Penicillium*, *Mucor* và *Fusarium* (Young, 2006).



Hình 2. Kết quả điện di SSCP phân tích đa dạng cấu trúc tập đoàn nấm trong 9 mẫu đất HDN1 đến HDN9, số ghi bên phải các băng DNA là tên của các dòng được xác định trình tự nucleotide.



Hình 3. Cây phát sinh loài một số dòng tách từ gel SSCP 9 mẫu đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng và các chủng vi nấm đại diện trên GenBank. Số Bootstrap lớn hơn 60 được ghi ở các nhánh. Thước đo phản ánh sự sai khác của 1 nucleotide trên 100 nucleotide so sánh.

Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, đã phân lập được 13 chủng nấm sợi có hình thái khác nhau

(Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Dựa trên các đặc điểm hình thái 3 chủng FDN20, FDN21 và FDN22

được định tên lần lượt là *Aspergillus fumigatus* Freseni, *Aspergillus terreus* Thom và *Curvularia lunata* Boedijin (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005; Nguyễn Thanh Thủy *et al.*, 2006). So với công bố trước đây, kết quả trong nghiên cứu này cho thấy đa dạng vi nấm nói riêng và vi sinh vật nói chung ở tự

nhiên lớn hơn rất nhiều so với vi sinh vật nuôi cấy được trong phòng thí nghiệm. Hiện nay các nhà nấm học cho rằng khoảng 1,5 triệu loài nấm ở môi trường tự nhiên, tuy nhiên mới khoảng 74000 loài chiếm từ 5 - 10% đã được xác định và phân loại (Bridge, Spooner, 2001; Kennedy, Clipson, 2003).

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

Dòng	Số đăng ký trên GenBank	Nấm gần gũi nhất	% tương đồng
1HDN2	DQ986919	<i>Capnobotryella renispora</i> UAMH 9870	99
5HDN7	DQ986920	<i>Anguillospora furtiva</i> CCM F-20483	98
6HDN7	DQ986921	<i>Anguillospora furtiva</i> CCM F-20483	98
7HDN2	DQ986922	<i>Cladosporium staurophorum</i> STE-U 3687	99
8HDN9	DQ986923	<i>Cudoniella clavus</i> BM18#13, <i>Cladosporium staurophorum</i> STE-U 3687,	98
9HDN3	DQ986924	Uncultured eukaryote clone RT3n2	97
10HDN7	DQ986925	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53	98
11HDN1	DQ986926	<i>Setosphaeria monoceras</i> CBS 154.26	99
12HDN8	DQ986927	<i>Aspergillus fumigatus</i> ALI 57	99
13HDN1	DQ986928	<i>Talaromyces leycettanus</i> CBS 398.68	99
14HDN3	DQ986929	<i>Penicillium commune</i> IBT 15141	99
15HDN2	DQ986930	<i>Hymenoscyphus ericae</i> UAMH 8873	99
16HDN6	DQ986931	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53	97
17HDN2	DQ986932	<i>Exophiala</i> sp. NH3-6	99
18HDN7	DQ986933	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53	98
19HDN9	DQ986934	<i>Tetrachaetum elegans</i> 30-426	98
20HDN3	DQ986935	<i>Nectria lugdunensis</i> CBE98	99
21HDN4	DQ986936	<i>Cordyceps sinensis</i> RE2-4-3, <i>N. lugdunensis</i> CBE98	99
22HDN6	DQ986937	<i>Fusarium oxysporum</i> 26-1, <i>N. lugdunensis</i> CBE98	99
23HDN2	DQ986938	<i>Coniochaeta ligniaria</i> C8	99
24HDN3	DQ986939	<i>Ophiostomatales</i> sp. C6, <i>Coniochaeta ligniaria</i> C8	99
25HDN9	DQ986940	<i>Ophiostomatales</i> sp. C6	99
26HDN7	DQ986941	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53	98
27HDN9	DQ986942	<i>Togninia minima</i> CBS213.31	98
36HDN5	DQ986943	<i>Lewia infectoria</i> IMI 303186	99
44HDN5	DQ986944	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53	98
45HDN1	DQ986945	Uncultured eukaryote clone RT3n2, <i>Cladosporium staurophorum</i> STE-U 3687	99

Nấm đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái tự nhiên và xã hội con người. Trong đất, nấm là nhân tố quan trọng trong chu trình vật chất. Nhờ có cấu tạo dạng sợi mà nấm sợi có thể xuyên sâu trong đất giúp quá trình phân hủy các hợp chất gây ô nhiễm môi trường được dễ dàng. Nhờ enzyme ligninolytic ngoại bào hoặc cytochrome monooxygenase P450 mà nấm có khả năng phân hủy các chất độc gây ô nhiễm môi trường trong đó có dioxin (Hiraishi, 2003). Tuy nhiên hiện nay các nghiên cứu đều mới tập trung vào khả năng phân hủy các chất độc của các chi nấm đảm (*Basidiomycota*) hay chi nấm lớn (Hiraishi, 2003). *Penellus stypticus*, *Phanerochaete chrysosporium* và *Trichosporon mucoides* đều có khả năng oxy hóa, phân hủy dibenzofuran và 2,4-D (Valli, 1990; Hammer *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2002; Mori, Kondo, 2002; Hiraishi, 2003). Chỉ có một công bố về *Acremonium* sp. có khả năng sử dụng loại chất độc này (Kunichika *et al.*, 2001). Các nghiên cứu về nấm sợi sử dụng dioxin, furan, 2,4-D chưa được công bố nhiều. Ở Việt Nam, một số chủng nấm sợi sử dụng các hợp chất hydrocarbon thơm đa nhân và 2,4-D đã được phân lập (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Ba chủng nấm *Aspergillus fumigatus* Freseni FDN20, *Aspergillus terreus* Thom FDN21 và *Curvularia lunata* Boedijin FDN22 phân lập từ đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng phân hủy được 72,92 µg/ml, 4,67 µg/ml và 88,66 µg/ml 2,4-D. Dibenzofuran có cấu trúc hóa học tương tự với dioxin và được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để đánh giá khả năng phân hủy sinh học dioxin và các hợp chất tương tự. Sau 10 ngày nuôi cấy các chủng nấm sợi FDN20, FDN21, có khả năng phân hủy dibenzofuran là 388,67 µg/ml và 103,69 µg/ml (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005, Hoàng Thị Mỹ Hạnh *et al.*, 2004).

Một số nghiên cứu khác còn cho thấy vi nấm thuộc các chi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* và *Clasdosporium* có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ vòng thơm (Cerniglia, 1993).

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy đa dạng thực sự của nấm trong đất nhiễm chất độc rất lớn do vậy tập đoàn nấm sợi tồn tại trong vùng đất nhiễm chất độc hóa học này cần được quan tâm nhiều hơn. Chắc chắn những nghiên cứu khoa học cơ bản về vi nấm sẽ phục vụ trực tiếp công nghệ phân hủy sinh học do những ưu điểm của chúng trong quá trình chuyển hóa và khoáng hóa chất độc hóa học. Ngoài ra kết quả đa dạng vi nấm trong nghiên cứu này sẽ hữu ích cho các nghiên cứu biến động cấu trúc tập đoàn vi nấm trong quá trình xử lý khử độc chất độc

hóa học bằng công nghệ phân hủy sinh học đang được Viện Công nghệ sinh học thực hiện tại các căn cứ quân sự cũ của Mỹ trong chiến tranh Việt Nam.

KẾT LUẬN

Đã đánh giá được mức độ đa dạng tập đoàn nấm trong 9 mẫu đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng dựa trên so sánh đoạn gen 18S rRNA. Các mẫu ở rìa bãi nhiễm (vị trí mà thực vật mọc được) và mẫu có độ ô nhiễm thấp hơn có độ đa dạng vi nấm cao hơn các mẫu ở giữa bãi có nồng độ chất độc cao hơn. Tập đoàn nấm có quan hệ gần gũi với các chi vi nấm như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Clasdosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum*, *Exophiala*, *Setosphaeria*, *Mycosphaella*... Các chi vi nấm phổ biến trong đất nhiễm chất độc hóa học gồm *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Clasdosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum*.

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 và Quỹ học bổng DAAD (Cộng hòa Liên bang Đức).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anderson IC, Cairney JWG (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* 6: 769-779.
- Bridge P, Spooner B (2001) Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil* 232: 147-154.
- Cerniglia CE (1993) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocaccbons. *Curr Opin Biotech* 4: 331-338.
- 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.
- Hammer E, Krowas D, Schofer A, Specht M, Francke

W, Schauer F (1998) Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast identification of oxidation and ring cleavage products. *Appl Environ Biotechnol* 64: 2215-2219.

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

Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thanh Thủy, Ngô Xuân Quý, Nghiêm Xuân Trường, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2004) Khả năng phân hủy 2,4-D và dibenzofuran của chủng nấm sợi FDN20. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(4): 517-528.

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

Kennedy N, Clipson N (2003) Fingerprinting the fungal community. *Mycologist* 17: 158-164.

Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Meth* 58: 169-188.

Kunichika N, Tohr F, Ishii K (2001) Biodegradation of an actual dioxin-contaminated soil by *Acremonium* sp. 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs Vol 54: 234-237.

Lowell JL, Klein DA (2001) Comparative single-strand conformation polymorphism (SSCP) and microscopy-based analysis of nitrogen cultivation interactive effects on fungal community of a semiarid steppe soil. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 85-92.

Mori T, Kondo R (2002) Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by wood-rott fungi. Screened by dioxin degrading ability. *FEMS Microbiol Lett* 213:

127-131.

Narain Rai JP (1992) Effects of long-term 2,4-D application on microbial population and biochemical processes in cultivated soil. *Biol Fertil Soils* 13:187-191.

Nguyễn Thanh Thủy, Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2006) Nghiên cứu đặc điểm hình thái, khả năng phân hủy chất độc và phân loại của chủng nấm sợi FDN22 phân lập từ lô thử nghiệm xử lý đất nhiễm chất độc hóa học. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(1): 125-132

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.

Sato A, Watanabe T, Watanabe Y, Harasono K, Fukatsu T (2002) Screening for *Basidiomycetous* fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin. *FEMS Microbiol Lett* 213: 213-217.

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.

Valli K (1990) Degradation of 2,4 - dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biotechnol* 173: 345-352.

Young AL (2006) Enhanced co-metabolism of TCDD in the presence of high concentrations of phenoxy herbicides. *Environ Sci Pollut Res Int* 13(3): 149-150.

CHARACTERISATION OF FUNGAL DIVERSITY IN TOXIC CHEMICALS CONTAMINATED SOIL BASED ON ANALYSIS OF 18S rRNA GENE BY SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM

Nguyen Ba Huu^{1,2,*}, Dang Thi Cam Ha¹, Nong Van Hai¹, Dietmar H Pieper²

¹Institute of Biotechnology, Hanoi, Vietnam

²Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

SUMMARY

More than 30 years since the Vietnam War passed but some former military bases in central and southern Vietnam were heavily contaminated by toxic chemicals (herbicides) including dioxin and dioxin like-compounds. They are “hot spots” and decomposition of contaminants in these bases is to be solved.

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

Bio-stimulation of native microorganisms in order to degrade contaminants is a cost effective and environmental safety method. During biodegradation process of toxicants, soil fungi play an important role. However, estimates suggested that only 5 - 10% fungal species have been described formally and cultivated in laboratory conditions. Recently, molecular biological tools based on nucleic acids such as single strand conformation polymorphism (SSCP) were widely applied in study of microbial and fungal diversity. In this study, culture independence fungal diversity in nine soil samples containing different concentrations of dioxin that were collected from former military base in Danang airport, was characterised based on analysis of fingerprinting a part of 18S rRNA gene on SSCP. Less contaminated and bordered samples showed lower fungal diversity than heavy contaminated samples collected in the central area. Fungal population is closed to fungal genera such as *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Clasdosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrãchaetum*, *Exophiala*, *Setosphaeria*, *Mycosphaella* etc. However, dominant fungal genera in these contaminated soils are *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Clasdosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum*.

Keywords: *Biostimulation, fungal, herbicide, microbial diversity, SSCP, 18S rRNA*