

SỬ DỤNG KỸ THUẬT PCR-DGGE XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC TẬP ĐOÀN VI KHUẨN KHỦ SULATE TRONG MẪU Bùn HỒ NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN TẠI SÂN BAY ĐÀ NẴNG

Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Bá Hữu, Đàm Thúy Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Hiện nay, đất và bùn hồ thuộc một số “điểm nóng” trong đó có căn cứ quân sự cũ của Mỹ tại sân bay Đà Nẵng vẫn bị ô nhiễm nặng các chất diệt cỏ chứa dioxin. Công nghệ phân hủy sinh học đã được áp dụng thành công để khử độc đất nhiễm tại Đà Nẵng và có triển vọng trong việc xử lý bùn hồ nhiễm. Vi sinh vật kỵ khí trong đó có vi khuẩn khử sulfate đóng vai trò quan trọng trong chu trình chuyển hóa vật chất và khử loại chlor tại các mẫu trầm tích. Các kỹ thuật dựa trên nuôi cấy thường chỉ phản ánh được một phần nhỏ tập đoàn vi sinh vật. Hiện nay, các kỹ thuật dựa trên gen mã hóa rRNA trong đó có DGGE (điện di trên gel với dải nồng độ chất biến tính) đang được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR lồng kết hợp với DGGE đã được sử dụng để đánh giá tập đoàn vi khuẩn khử sulfate trong các mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng. Chưa thấy sự khác nhau rõ rệt giữa các mẫu bùn nhiễm và không nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin trong các hồ. Tập đoàn vi khuẩn khử sulfate không biến động nhiều giữa hai đợt lấy mẫu. Chưa thấy sự khác nhau rõ rệt giữa các mẫu của hồ chịu ảnh hưởng trực tiếp nước từ bãi nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin và hai hồ không bị tác động của bãi nhiễm. Một số băng DNA có mức độ đậm nét và chi xuất hiện ở 1 hoặc vài mẫu bùn. Hai mẫu A4 và A8 có mức độ đa dạng thấp nhất trong 13 mẫu bùn.

Từ khóa: Bùn hồ, chất diệt cỏ chứa dioxin, Đà Nẵng, DGGE, vi khuẩn khử sulfate, 16S rRNA

MỞ ĐẦU

Trong khoảng 10 năm từ 1961 đến 1971 quân đội Mỹ đã rải khoảng 80 triệu lit các chất diệt cỏ chứa dioxin xuống nhiều vùng ở miền Trung và Nam Việt Nam (Stellman *et al.*, 2003). Căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng là một trong số các điểm nóng hiện nay vẫn bị ô nhiễm nặng các chất diệt cỏ chứa dioxin (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Một số kết quả phân tích gần đây cho thấy không những đất mà cả bùn trong hồ tiếp nhận nước chảy từ bãi nhiễm đã chứa dioxin ở các nồng độ khác nhau (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Vi khuẩn kỵ khí tùy tiện và vi khuẩn kỵ khí bắt buộc trong đó có vi khuẩn khử sulfate (KSF) đóng vai trò rất quan trọng trong phân hủy tự nhiên hoặc làm sạch bằng phân hủy sinh học trầm tích bị ô nhiễm.

Tuy nhiên, phân lập vi khuẩn KSF từ các mẫu môi trường đôi khi không dễ dàng. Hiện nay, các phương pháp dựa trên nuôi cấy thường chỉ xác định được một phần nhỏ tập đoàn vi khuẩn ngoài tự nhiên. Các phương pháp không phụ thuộc nuôi cấy khác nhau trong đó có PCR kết hợp điện di trên gel chứa dải nồng độ chất biến tính kết hợp (PCR-

DGGE) đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2006).

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR-DGGE đã được sử dụng để đánh giá sơ bộ tập đoàn vi khuẩn KSF trong mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu bùn hồ

Mẫu bùn được lấy từ ba hồ A, B và C sau khi loại bỏ khoảng 3 - 5 cm lớp trầm tích bề mặt. Hồ A là hồ nhận trực tiếp nước chảy từ bãi nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng. Năm mẫu trầm tích A1 - A5 ở hồ A được lấy ở thời điểm 1/2007 và năm mẫu khác A6 - A10 được lấy ở thời điểm 3/2007. Mẫu trầm tích hai hồ B và C được lấy ở thời điểm 3/2007, hai hồ này không bị ảnh hưởng bởi nước chảy từ bãi đất nhiễm. Hai mẫu ở hồ B được ký hiệu B1 và B2, mẫu ở hồ C được ký hiệu là C1. Mẫu được bảo quản ở 4°C đến khi phân tích.

Sử dụng kỹ thuật PCR lồng nhân đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn KSF

DNA tổng số của 13 mẫu bùn hồ được tách chiết và làm sạch theo mô tả ở UntraClean Soil DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc) và bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng. Đoạn gen mã hóa 16S rRNA của vi khuẩn KSF được nhân lên nhờ kỹ thuật PCR lồng. Đầu tiên, đoạn gen gần 1.500 bp của vi khuẩn được nhân lên bằng phản ứng PCR với DNA tổng số mẫu bùn, cặp mồi 27F và 1492R (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2006). Phản ứng PCR tiếp theo sử dụng DNA khuôn từ sản phẩm PCR kể trên với cặp mồi đặc hiệu (DCC305GC và DSV838) cho một số nhóm vi khuẩn KSF (Castro *et al.*, 2000). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: 94°C - 4 phút; 94°C - 1 phút, 57°C - 1 phút, 72°C - 1 phút, lặp lại 35 chu kỳ; 72°C - 8 phút; giữ sản phẩm PCR ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,8%, nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới UV.

DGGE

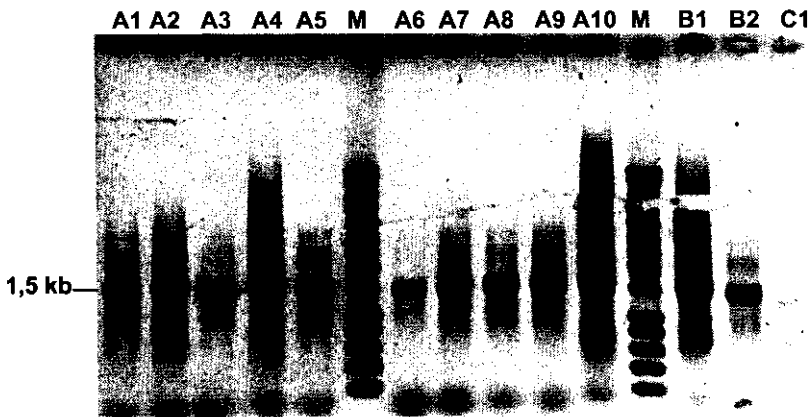
50 µl sản phẩm PCR nhân đoạn gen 16S rRNA nhóm vi khuẩn KSF được tra vào các giếng trên gel acrylamide/bisacrylamide với dải nồng độ chất biến tính urea/formamide, điện di, nhuộm DNA trong gel với ethidium bromide, kiểm tra dưới UV và chụp ảnh theo mô tả của Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả (2006).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA từ tập đoàn vi khuẩn KSF trong các mẫu bùn hồ

DNA tổng số được tách chiết từ 13 mẫu bùn của các hồ A, B và C có độ tinh sạch và ít đứt gãy (kết quả không trình bày ở đây). Cặp mồi 27F và 1492R được thiết kế để nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA ở nhiều nhóm vi khuẩn khác nhau. Kết quả ở hình 1 cho thấy, sản phẩm PCR nhân được ở các mẫu bùn đều có kích thước khoảng 1500 bp như tính toán lý thuyết. Riêng mẫu bùn C1, sản phẩm thu được ít hơn so với các mẫu khác.

Vi khuẩn KSF là nhóm vi khuẩn kỵ khí phát triển mạnh trong điều kiện không có oxy, tuy nhiên một số chủng có thể chịu được môi trường có ít oxy (Dolla *et al.*, 2006). Các vi khuẩn này thu nhận năng lượng cho quá trình phát triển bằng cách oxy hóa các chất dinh dưỡng hữu cơ hoặc H₂ đồng thời với việc khử sulfate (SO₄²⁻) thành sulfite (H₂S, HS) (Odom *et al.*, 1993, Rabus *et al.*, 2006). Quá trình khử sulfate ở vi khuẩn KSF được gọi là “khử sulfate dị hóa”, trong khi đó quá trình “khử sulfate đồng hóa” được thực hiện để khử sulfur cho quá trình sinh tổng hợp (ví dụ cysteine). Quá trình “khử sulfate đồng hóa” cũng là quá trình sinh hóa phổ biến ở trong các sinh vật tiền nhân và thực vật, thông thường quá trình này không thải ra sulfite (Rabus *et al.*, 2006).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA từ DNA tổng số mẫu bùn hồ với cặp mồi 27F và 1492R. M: thang DNA chuẩn Smart 200 bp (Eurogentec).

Đến tận đầu những năm 80 của thế kỷ 20, vi khuẩn KSF vẫn được phân loại theo phương pháp truyền thống dựa trên các đặc điểm như khả năng sử

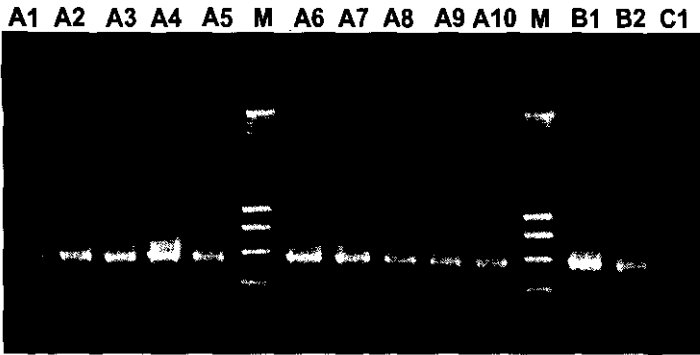
dụng nguồn carbon, hình thái và các chỉ thị hóa học hoặc sinh hóa hoặc kết hợp cả hai loại chỉ thị này. Sau đó, khi phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA

trở nên phổ biến trong các nghiên cứu sinh thái học, kỹ thuật này đã được sử dụng trong hệ thống học vi khuẩn KSF. Loài vi khuẩn KSF đầu tiên được xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA đó là *Desulfovibrio desulfuricans*. Hiện nay, các vi khuẩn KSF được xếp trong ba nhánh chính, dưới lớp δ -*proteobacteria* với hơn 25 chi; vi khuẩn KSF Gram dương với hai chi *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*; nhánh thứ ba gồm *Thermodesulfobacterium* và *Thermodesulfovibrio* (Castro *et al.*, 2000; Rabus *et al.*, 2006).

Trong các vùng ô nhiễm các hợp chất hữu cơ chứa chlor khó phân hủy một số nhóm vi khuẩn kỵ khí KSF và khử loại clo có số lượng thấp và khó phân lập bằng các kỹ thuật nuôi cấy truyền thống. Để đánh giá thực trạng tập đoàn vi khuẩn trong môi trường tự nhiên, một số kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên PCR đã được sử dụng để

nghiên cứu đa dạng vi sinh vật trong đó có kỹ thuật PCR lồng (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2006; Friis *et al.*, 2007). Kỹ thuật PCR lồng kết hợp điện di trên gel với dải nồng độ các chất biến tính đã được Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả ứng dụng để phát hiện vi khuẩn khử loại clo *Dehalococcoides* trong công thức xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin bằng phân hủy sinh học trong công thức chôn lấp tích cực 10 m³ (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2006).

Kết quả ở hình 2 cho thấy sản phẩm PCR thu được có kích thước hơn 500 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết. Như vậy, bằng việc sử dụng kỹ thuật PCR lồng với cặp mồi đa năng và cặp mồi đặc hiệu cho vi khuẩn khử sulfate đã nhận được hỗn hợp các đoạn gen mã hóa 16S rRNA từ vi khuẩn khử sulfate trong các mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR gen mã hóa 16S rRNA của vi khuẩn khử sulfate trong các mẫu bùn hồ sân bay Đà Nẵng sử dụng cặp mồi 305F(GC) và 838R. M: thang DNA chuẩn Smart 200bp (Eurogentec).

Phân tích cấu trúc tập đoàn vi khuẩn KSF trong bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin bằng kỹ thuật DGGE

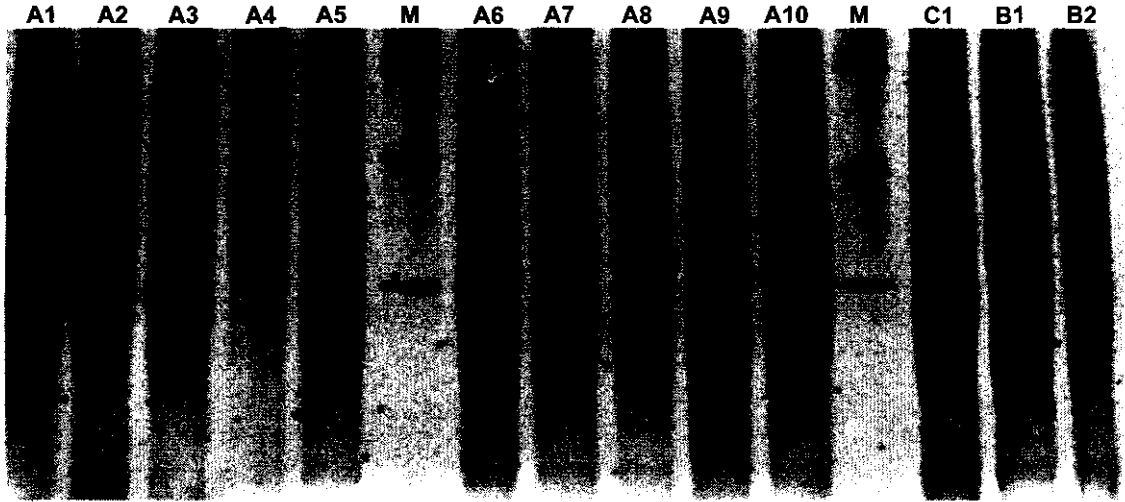
Nghiên cứu trước đây của Nguyễn Thị Sánh và đồng tác giả (2005) cũng đã phân lập được tập đoàn vi khuẩn KSF có khả năng chuyển hóa dioxin từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở Đà Nẵng. Gần đây, Nguyễn Việt Tiến đã thông báo về kết quả phân lập 3 chủng vi khuẩn khử sulfate từ đất trong các công thức xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở Đà Nẵng bằng phân hủy sinh học (Nguyễn Việt Tiến *et al.*, 2007). Tuy nhiên, các tác giả cũng có những khó khăn trong quá trình phân lập.

Cặp mồi DCC305 và DSV838 được thiết kế đặc

hiệu cho các nhóm vi khuẩn kỵ khí KSF dùng để nhân đoạn gen 16S rRNA trong vùng chứa các nucleotide thay đổi của vi khuẩn thuộc nhóm 5 (*Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*) và nhóm 6 (*Desulfovibrio* và *Desulfomicrobium*) (Daly *et al.*, 2000). Kết quả ở hình 3 cho thấy sự xuất hiện của nhiều băng DNA trong các mẫu khác nhau. Không có sự khác nhau nhiều giữa các đợt lấy mẫu, có thể do thời gian giữa hai đợt lấy mẫu không xa nhau và các mẫu được lấy ở các vị trí gần nhau chứ không trùng vị trí. Cả ba hồ A, B và C đều nằm trong khu vực mà trước đây được sử dụng làm căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng. Hồ A là nơi nhận nước chảy trực tiếp từ bãi nhiễm nặng chất diệt cỏ chứa dioxin. Chưa thấy sự khác nhau rõ rệt về các băng DNA trên gel DGGE

giữa các mẫu trong hồ A và hai hồ B và C (không bị tác động trực tiếp của bãi nhiễm). Như vậy, sự phân bố vi khuẩn KSF ở ba hồ kể trên chưa khác nhau nhiều và có thể các chất diệt cỏ, dioxin cũng chưa có ảnh hưởng lớn đến tập đoàn vi khuẩn KSF ở ba hồ này. Tuy nhiên, một số băng DNA có mức độ đậm nét và chỉ xuất hiện ở 1 hoặc vài mẫu bùn. Hai mẫu A4 và A8 có mức độ đa dạng thấp nhất trong 13 mẫu bùn.

Kết quả phân tích DGGE cho thấy sự khác nhau về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn KSF trong các mẫu và giữa các hồ. Để có bức tranh rõ ràng hơn về sự phân bố tập đoàn vi khuẩn KSF ở ba hồ kể trên cần tiến hành xác định trình tự một số băng DNA đại diện trên gel DGGE, so sánh với trình tự gen mã hóa 16S rRNA của các vi khuẩn khử sulfate đã công bố và tiến hành khảo sát tập đoàn vi khuẩn KSF với số lượng mẫu bùn hồ lớn hơn.



Hình 3. Điểm chỉ phân tử đoạn gen mã hóa 16S rRNA vi khuẩn khử sulfate trên gel DGGE các mẫu bùn ở khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin. M: thang DNA Smart 200 bp (Eurogentec).

KẾT LUẬN

Kỹ thuật PCR lồng kết hợp với DGGE đã được sử dụng thành công xác định cấu trúc tập đoàn vi khuẩn KSF trong 13 mẫu bùn của 3 hồ khu vực bãi nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng. Đã có sự xuất hiện của nhiều băng DNA trong các mẫu bùn khác nhau. Giữa các đợt lấy mẫu chưa có sự khác nhau nhiều về tập đoàn vi khuẩn KSF có thể do thời gian giữa hai đợt không xa nhau và các mẫu được lấy ở các vị trí không trùng nhau. Chưa thấy sự khác nhau rõ rệt giữa các mẫu của hồ chịu ảnh hưởng trực tiếp nước từ bãi nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin và hai hồ không bị tác động của bãi nhiễm. Một số băng DNA có mức độ đậm nét và chỉ xuất hiện ở 1 hoặc vài mẫu bùn. Hai mẫu A4 và A8 có mức độ đa dạng thấp nhất trong 13 mẫu bùn.

Lời cảm ơn: Công trình có sự hỗ trợ kinh phí của

Đề tài "Ứng dụng một số kỹ thuật sinh học phân tử để nghiên cứu tính đa dạng vi khuẩn kỵ khí (khử sulfate và loại khử chlor) trong tập đoàn vi sinh vật nhận được từ các lô xử lý chất độc hóa học bằng công nghệ phân hủy sinh học" thuộc chương trình nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên (Bộ Khoa học và Công nghệ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Castro HF, Williams NH, Ogram A (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 31: 1-9.
- Daly K, Sharp RJ, McCarthy AJ (2000) Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology* 146: 1693-1705.

Đặng Thị Cẩm Hà, Phạm Hữu Lý, Nguyễn Bá Hữu,

Nguyễn Thị Đệ, Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Dương 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.

Dolla A, Fournier M, Dermoun Z (2006) Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J Biotechnol* 126: 87-100.

Friis AK, Edwards EA, Albrechtsen HJ, Udell KS, Duhamel M, Bjerg PL (2007) Dechlorination after thermal treatment of a TCE-contaminated aquifer: Laboratory experiments. *Chemosphere* 67: 816-825.

Nguyễn Bá Hữu, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2006) Sử dụng kỹ thuật điện di trên gel chứa dải 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* 4(4): 519-527.

Nguyễn Thị Sánh, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm

Hà (2005) Phân loại và nghiên cứu ảnh hưởng của các nhân tố nuôi cấy đến sinh trưởng của vi khuẩn kỵ khí tùy tiện *Sedn1* từ đất nhiễm chất độc hóa học ở Đà Nẵng. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(2): 257-264.

Nguyễn Viết Tiến, Nguyễn Thị Sánh, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Cẩm Hà, Nghiêm Ngọc Minh (2007) Nghiên cứu định loại 3 chủng vi khuẩn khử sunphat phân lập tại lò xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin bằng công nghệ phân hủy sinh học tại sân bay Đà Nẵng. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* số 10 + 11: 41-44.

Odom JM, Singleton RJr (1993) The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives. Odom JM, Singleton RJr, editors, New York, NY: Springer-Verlag, Inc.

Rabus R, Hansen T, Widdel F (2006) Chapter 1.22: Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes, Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry, In "Prokaryotes", Springer New York: 659-768.

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.

USE OF PCR-DGGE TECHNIQUE TO ANALYSE SULFATE-REDUCING BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE IN LAKE SEDIMENTS IN THE HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED AREA AT DANANG AIRPORT

Nghiêm Ngọc Minh, Nguyen Ba Huu*, Dam Thuy Hang, Dang Thi Cam Ha

Institute of Biotechnology

SUMMARY

At present, soil and lake sediments in some "hot spots" including US former military base in Danang were still heavily contaminated by herbicide/dioxin. Bioremediation technology was successfully applied for detoxification of polluted soil at Danang and has been potential to treat contaminated lake sediments. In general, anaerobic bacteria which include sulfate reducing bacteria play an important role in material transformation cycle and dechlorination in sediments. Culture based techniques usually enables isolation of a small fraction of microbial community. Now, rRNA dependent techniques including DGGE (denature gel gradient electrophoresis) are widely used in studies of microbial ecology. In this report, nested-PCR combined DGGE were used to analyse sulfate reducing bacterial community in lake sediments at herbicide/dioxin contaminated area in Danang. There was no significant difference between contaminated and uncontaminated lake sediments and between lakes which are under direct and indirect influence from contaminated area. Sulfate reducing bacterial community was not changed so much during two sampling times. Some

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

strong DNA bands appeared only in one or several sediments. Among 13 lake sediments, two A4 and A8 samples showed the lowest diverse level of sulfate reducing bacteria.

Keywords: *Danang, DGGE, herbicide/dioxin, lake sediment, sulfate-reducing bacteria, 16S rRNA*