

SỰ ĐA DẠNG CỦA VI KHUẨN TRONG NƯỚC THẢI KHU CÔNG NGHIỆP TỪ LIÊM QUA HỆ THỐNG XỬ LÝ AEROTEN

Cung Thị Ngọc Mai, Nguyễn Ngọc Minh

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Sự đa dạng của các nhóm vi khuẩn có khả năng phân hủy các hợp chất vòng thơm (PAHs) trong nước thải của khu công nghiệp Từ Liêm trước và sau khi xử lý qua hệ thống xử lý nước thải hiếu khí (Aeroten) được đánh giá bằng kỹ thuật điện di gel gradient biến tính (DGGE) trong nghiên cứu này. Với dải nồng độ acrylamide/bis-acrylamide biến tính từ 35% đến 65%, 16S rDNA của các nhóm vi khuẩn nuôi cấy và không nuôi cấy được đã được phân tách trên gel acrylamide/bis-acrylamide 6%. Trình tự 16S rDNA của ba nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế và thể hiện khác biệt về mặt độ đã được phân tích và xác định trình tự. Trình tự 16S rDNA của 3 nhóm vi khuẩn này có độ tương đồng cao so với gen tương ứng của các nhóm vi khuẩn không nuôi cấy trên ngân hàng gen NCBI. Trình tự 16S rDNA của chúng vi khuẩn BTL12.1 tương đồng 91% với gen tương ứng của chúng vi khuẩn *Flavobacterium* sp. W2S82 và CJRA42 có trong nước thải được phẩm có chứa hợp chất vòng thơm và nước ô nhiễm nitrate, uranium. 16S rDNA của chúng vi khuẩn BTL12.7 thể hiện độ tương đồng 98% với gen tương ứng của vi khuẩn *Betaproteobacteria* QEDN10AE08 từ bùn của quá trình xử lý kỵ khí, 98% với nhóm vi khuẩn từ nước thải chứa các hợp chất hữu cơ, 97% với vi khuẩn *Thauera minoaromatica* S2 có khả năng phân hủy hợp chất vòng thơm. Chúng vi khuẩn BTL13.1 tương đồng 16S rDNA đạt 95% so với gen của chúng vi khuẩn Smb39 từ hệ thống xử lý UASB trong xử lý nước thải hữu cơ, 94% với vi khuẩn *Veillonella* sp. clone V26 có khả năng phân hủy chất béo, 92% với vi khuẩn từ nước thải của nhà máy thực phẩm (chúng 1429 và LM12-14). Trình tự của 3 chủng vi khuẩn BTL12.1, BTL12.7, BTL13.1 đã được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) với mã số truy cập lần lượt là HM449084, HM449085, HM449086.

Từ khóa: DGGE, nước thải công nghiệp, phân hủy PAHs, phân hủy sinh học, sự đa dạng tập đoàn vi sinh vật không qua nuôi cấy

MỞ ĐẦU

Trước đây, việc phát hiện và miêu tả các đặc điểm của tập đoàn vi sinh vật trong đất và nước bị ô nhiễm bị giới hạn vì chỉ có 1 lượng nhỏ các vi sinh vật là có thể nuôi cấy được trong phòng thí nghiệm. Người ta đã ước tính trong 1 gram đất có thể chứa hơn 1000 loài vi sinh vật (VSV) khác nhau, nhưng chỉ có 1% số lượng VSV trên là có khả năng nuôi cấy được (Rossello-Mora, Amann, 2001). Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để phát hiện các nhóm vi sinh vật không phụ thuộc nuôi cấy tại các vị trí ô nhiễm sẽ giúp các nhà khoa học hiểu biết rõ hơn về đặc tính cũng như các cơ chế phân hủy sinh học của những nhóm vi sinh vật. Gần đây, một số kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên việc phân tích trình tự acid nucleic được sử dụng để phát hiện sự đa dạng của những nhóm VSV như kỹ thuật ARDRA, RISA, DGGE/TGGE, T-RFLP, FISH...(Malik *et al.*, 2007; Trần Minh Thảo, Đoàn Thanh Phương, 2008;...) Trong bài báo này chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis -

DGGE) để đánh giá cấu trúc tập đoàn vi sinh vật có khả năng phân hủy PAHs trong nước thải của khu công nghiệp vừa và nhỏ Từ Liêm Hà Nội với hệ thống xử lý Aeroten ở quy mô 5 - 10 l.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Mẫu nước thải được lấy từ bể chứa của khu công nghiệp vừa và nhỏ Từ Liêm Hà Nội ở các vị trí khác nhau.

Mẫu nước thải sau xử lý được lấy từ hệ thống xử lý Aeroten ở quy mô 5 - 10 l.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số

Mẫu nước thải trước và sau xử lý được chúng tôi tiến hành tách chiết theo phương pháp của Zhou và đồng tác giả (1996).

Nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA từ mẫu nước thải đầu vào và từ hệ thống xử lý quy mô 5 l.

Đoạn gen mã hóa 16S rRNA được nhân lên bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi: 341F* (5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG -3') và 907R (5'- CCG TCA ATT CCT TTT AGT TT -3'). Mỗi xuôi chứa (*) là mồi được gắn kẹp GC-clamp (5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC CTC CCC GCC GCC CCC GCC CGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G -3').

Hỗn hợp phản ứng (25 µl) gồm các thành phần như sau: buffer taq 10X (2.5 µl); MgCl₂ 25 mM (3 µl); dNTPs 2.5 mM (2.5 µl); mồi 341F-GC 20 µmol (1 µl); mồi 907R 20 µmol (1 µl); Taq polymerase 5 Unit/ µl (0.5 µl); ddH₂O (12.5 µl); DNA (2 µl).

Chu trình nhiệt độ được sử dụng như sau: 95°C (5 phút), 95°C (1 phút), 55°C (1 phút), 72°C (3 phút), lặp lại 35 chu kỳ từ bước 2 tới bước 4, 72°C (7 phút), 4°C để bảo quản.

Đánh giá sự đa dạng của tập đoàn vi sinh vật bằng kỹ thuật DGGE

Sản phẩm PCR sau khi được nhân lên với cặp mồi 341F-GC và 907R (có kích thước khoảng 600 bp) được sử dụng để chạy điện di DGGE. Kỹ thuật này được sử dụng để phân tách các băng nghiên cứu với nồng độ gel acrylamide/bis acrylamide 6% (dung dịch biến tính 100% chứa 7M urea), dài biến tính từ 35% đến 65% và được thực hiện trên thiết bị Dcode (Bio-Rad) ở 100V trong hệ đệm TAE 1X qua đêm ở 60°C. Gel được nhuộm bằng dung dịch ethidium bromide và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại để phát hiện sự đa dạng 16S rDNA của các nhóm vi sinh vật nuôi cấy và không nuôi cấy được.

Hóa chất sử dụng: hóa chất tinh khiết của các hãng: Sigma, Biorad, Biobasic,....

Bảng 1. Nồng độ biến tính gốc 0% và 80%.

	0% (25 ml)	80% (25 ml)
Acrylamid/bis-acrylamid	3,75	3,75 ml
TAE 50x	0,5	0,5 ml
Formanmide		8 ml
Urea		10,5 g
dH ₂ O	tới 25	tới 25 ml

Các băng DNA đậm nhất và thể hiện sự khác biệt nhất trước và sau xử lý được quan sát và cắt khỏi gel, tinh sạch và khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 341F và 907R, sản phẩm PCR được làm sạch và xác định trình tự nucleotide trên

máy ABI PRISM 3100 Avant Data Collection v.1.0. Trình tự nucleotide nhận được sẽ được xử lý, phân tích và so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI) nhờ công cụ BLAST.

Bảng 2. Nồng độ biến tính 35% và 65%.

	35% (13 ml)	65% (13 ml)
0%	7,31 ml	2,44 ml
80%	5,69 ml	10,56 ml
TEMED	11 µl	11 µl
APS 10%	110 µl	110 µl

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA tổng số

Trong kỹ thuật DGGE, việc tách chiết được DNA tổng số là việc làm quan trọng, tuy nhiên việc tách chiết được DNA tổng số từ mẫu môi trường là 1 việc làm khó khăn vì trong nước thải còn có nhiều các yếu tố khác ảnh hưởng tới hiệu quả tách chiết như các acid hữu cơ, humic acid... Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Zhou và đồng tác giả (1996). Sau khi tách chiết được DNA tổng số được kiểm tra. Kết quả cho thấy, DNA thu được gọn, rõ nét đủ điều kiện sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Nhân dòng đoạn gen mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR

Phản ứng nhân đoạn gen mã hóa 16S rDNA của các chủng vi sinh vật có trong nước thải xử lý với cặp mồi đặc hiệu là 341F-GC và 907R. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% (Hình 1).

Đánh giá sự đa dạng của tập đoàn vi sinh vật bằng kỹ thuật DGGE

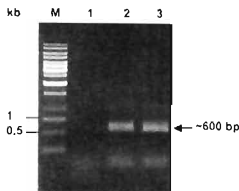
Sản phẩm PCR sau khi được nhân lên với cặp mồi (341F-GC, 907R) được tiến hành chạy điện di với dài nồng độ gel biến tính từ 35% tới 65% (Hình 2).

Với dài nồng độ biến tính 35% và 65% trên điện di đồ cho thấy, số lượng các nhóm vi sinh vật từ mẫu nước thải ban đầu và từ bùn hoạt tính trong hệ thống xử lý là khá đa dạng. Trong đó nhóm vi khuẩn ở vị trí 12.1, 12.2, 12.3, 12.4, 12.5, 12.6 rõ nét, khá đặc hiệu, xuất hiện trong cả mẫu trước và sau quá trình xử lý. Kết quả trên cho thấy, các nhóm vi khuẩn này đã có sẵn trong mẫu nước thải trước khi xử lý và không những chiếm ưu thế mà còn luôn tồn tại trong suốt thời gian xử lý. Ở mẫu nước thải ban đầu thấy xuất

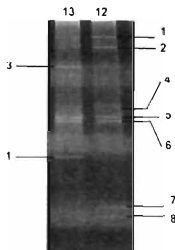
hiện thêm nhóm vi khuẩn ở vị trí 13.1 mà không có ở mẫu hệ thống (mẫu xử lý) điều này chứng tỏ có thể nhóm vi khuẩn ở những vị trí này là nhóm vi khuẩn bản địa không nuôi cấy được và trong điều kiện phòng thí nghiệm đã không tồn tại được. Riêng trong hệ thống xử lý có thêm 2 nhóm vi khuẩn ở vị trí 12.7, 12.8 có thể đây là 2 nhóm vi khuẩn có khả năng nuôi cấy được và số lượng qua ít nên không thấy xuất hiện ở mẫu ban đầu nhưng sau khi nuôi cấy ở trong phòng thí nghiệm, số lượng đã tăng lên nhiều nên có mặt ở mẫu nước sau xử lý. Bảng DNA ở các

vị trí: 12.1, 12.7 và 13.1 đã được chúng tôi chọn để cắt, thổi gel và dùng làm khuôn để khuếch đại lại lần 2 với chu trình nhiệt như ở lần thử nhất nhưng với cặp mồi 341F (không kẹp GC) và 907R. Sản phẩm PCR với kích thước khoảng 566 bp được tinh sạch và gửi đi xác định trình tự.

Mức độ tương đồng về trình tự gen của các chủng vi khuẩn BTL12.1, BTL12.7 và BTL13.1 được so sánh với các dòng vi khuẩn khác trên ngân hàng cơ sở dữ liệu quốc tế GenBank (NCBI) và được thể hiện ở bảng 3.



Hình 2. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA của mẫu thu được trước và sau quá trình xử lý nước thải sử dụng cặp mồi 341F-GC và 907R. M. Marker 1 kb, 1. Đối chứng (-); 2. Sản phẩm PCR từ mẫu nước xử lý. 3: Sản phẩm PCR từ mẫu thu sau quá trình xử lý.



Hình 2. Sản phẩm PCR thu được qua hệ thống DGGE của mẫu nước thải trước xử lý (13) và của mẫu sau xử lý (12) với dải nồng độ gel biến tính 35% và 65%.

Bảng 3 cho thấy, cả 3 chủng vi khuẩn được lựa chọn để xác định trình tự đều có độ tương đồng cao với các nhóm vi khuẩn không nuôi cấy được có trên GenBank và được đặt tên lần lượt là: Uncultured bacterium BTL12.1 (mã số: HM449084), Uncultured bacterium BTL12.7 (mã số: HM449085), Uncultured bacterium BTL13.1 (mã số: HM449086). Các nhóm vi khuẩn này tập trung nhiều ở các hệ thống xử lý nước thải có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ của các nhà máy sản xuất thực phẩm và cũng có khả năng phân hủy các hợp chất vòng thơm. Nhóm vi khuẩn thuộc các chi *Flavobacterium*, *Thauera*, *minoaromatica* (Hassan *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2009) đã có nhiều công bố về khả năng phân hủy PAHs hay các nhóm vi khuẩn không nuôi cấy được chi *Veillonella* từ các hệ thống xử lý nước thải chứa

các hợp chất hữu cơ và các chất béo (Parkinson, 2009). Do vậy những kết quả trong bài báo này đã phản ánh được phần nào vai trò của các chủng vi sinh vật không có khả năng nuôi cấy trong hệ thống xử lý. Theo một công bố khác của nhóm nghiên cứu tôi về nhóm vi sinh vật được phân lập từ nguồn nước thải này là *Bacillus stutzeri* (mã số: HM446015) có khả năng phân hủy 40,24% naphthalene và 54,17% anthracene (Trần Thị Khánh Vân, 2010). Chính vì vậy việc lựa chọn phương pháp xử lý kết hợp giữa làm giàu sinh học (bổ sung tập đoàn vi sinh vật đã làm giàu) và kích thích sinh học (tạo các điều kiện cho sự phát triển tập đoàn vi sinh vật bản địa) mà chúng tôi đã sử dụng sẽ duy trì được tập đoàn các vi sinh vật nuôi cấy và không nuôi cấy được để có thể xử lý nước thải với hiệu suất cao nhất.

Bảng 3. Mức độ tương đồng và trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng vi khuẩn BTL12.1, BTL12.7, BTL13.1 với trình tự một số chủng vi khuẩn đã công bố trên ngân hàng GenBank (NCBI).

Tinh tương đồng của chủng vi khuẩn BTL12.1				
TT	Dòng vi khuẩn	Tương đồng (%)	Mã số	Đặc điểm
1	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. clone W2S82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	GU294848	Nhóm vi khuẩn không nuôi cấy trong quá trình xử lý nước thải nhà máy dược phẩm, có khả năng phân hủy các hợp chất vòng thơm.
2	Uncultured bacterium clone P1C05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	93%	FJ416406	Nhóm vi khuẩn không nuôi cấy từ hệ thống xử lý nước thải
3	Uncultured bacterium clone CJRA42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	91%	DQ202147	Nhóm vi khuẩn không nuôi cấy trong quá trình xử lý nước mặt nhiễm nitrate và uranium.
Tinh tương đồng của chủng vi khuẩn BTL12.7				
TT	Dòng vi khuẩn	Tương đồng (%)	Mã số	Đặc điểm
1	Uncultured bacterium clone ambient_uncontrolled-61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	GU454922	Nhóm vi khuẩn không nuôi cấy từ bùn hoạt tính của nước thải chứa hợp chất hữu cơ.
2	Uncultured <i>Betaproteobacteria</i> bacterium 16S rRNA gene from clone QEDN10AE08	98%	CU926959	Vi khuẩn không nuôi cấy từ bùn của quá trình xử lý kỵ khí.
3	<i>Thauera minoromistica</i> strain S2 16S ribosomal RNA, partial sequence	97%	NR_027211	Nhóm vi khuẩn có khả năng phân hủy vòng thơm.
Tinh tương đồng của chủng vi khuẩn BTL13.1				
TT	Dòng vi khuẩn	Tương đồng (%)	Mã số	Đặc điểm
1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: 1429	92%	AB286542	Quá trình xử lý nước thải của nhà máy thực phẩm.
2	Uncultured bacterium clone UTFS-R119-79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	GQ455715	Nhóm vi khuẩn không nuôi cấy từ hệ thống SBR xử lý nước thải loại bỏ phosphorus
3	Uncultured bacterium clone LM12-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	DQ443913	Nhóm vi khuẩn lên men acid và khử sulfate có khả năng phân hủy lactate.
4	Uncultured <i>Veillonella</i> sp. clone V26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	GQ332226	Nhóm vi khuẩn không nuôi cấy có khả năng phân hủy chất béo.
5	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: SmB39	95%	AB291272	Nhóm vi khuẩn không nuôi cấy từ hệ thống xử lý UASB trong xử lý nước thải hữu cơ

KẾT LUẬN

Trình tự gen 16S rRNA của ba nhóm vi khuẩn đặc trưng thu được từ gel DGGE đã được xác định trình tự. Kết quả cho thấy, cả 3 chủng vi khuẩn này có độ tương đồng cao với các chủng vi khuẩn không nuôi cấy trên ngân hàng cơ sở dữ liệu Gen Bank (NCBI) và đã được đăng ký trình tự với mã số lần lượt là: HM449084, HM449085, HM449086. Đặc biệt, trình tự gen 16S rDNA của ba chủng vi khuẩn này có độ tương đồng cao (> 95%) với trình tự tương ứng của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Flavobacterium*, *Thauera*, *Veillonella*... trong nước thải có khả năng phân hủy hợp chất hữu cơ và hợp chất vòng thơm.

Lời cảm ơn: Hoàn thành bài báo này, chúng tôi chân thành cảm ơn TS. Đinh Thủy Hằng và nhóm nghiên cứu thuộc Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học thuộc Đại học quốc gia Hà Nội đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện thí nghiệm DGGE và sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Ứng dụng công nghệ vi sinh để xử lý nước thải có chứa các hợp chất hữu cơ hydrocarbon thơm đa vòng” mã số 01C-09/02-2009-2, giai đoạn 2009 - 2010 do Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hà Nội cấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Green SJ, Leigh MB, Neufeld JD (2009) *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial*

community analysis. Timmis KN (Ed) *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds*. Springer (Heidelberg, Germany): 4137-4158.

Hassan EA, Elsayed EH, Essam AZ (2006) *Naphthalene and phenol degradation by Flavobacterium sp. DQ398100 and Pseudomonas putida DQ399838 isolated from petroleum polluted soil*. Science Press, co-published with Springer-Verlag GmbH 25(1): 83-84.

Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R (2008) The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ Int* 34(2): 265-276.

Parkinson R (2009) Bacterial Communities Associated with Human Decomposition. A thesis submitted to the Victoria University of Wellington in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Science. Victoria University of Wellington.

Rossello-Mora R, Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25: 39-67.

Trần Minh Thảo và Đoàn Thanh Phương (2008) Xử lý nước thải có nồng độ chất hữu cơ cao trong điều kiện hiếu khí ưa nhiệt. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng* 1(24).

Trzesicka-Mlynarz D, Ward OP (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures obtained from PAH-contaminated soil. *Can J Microbiol* 41(6): 470-476.

Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) Isolation DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316-322.

DIVERSITY OF BACTERIA FROM SEWAGE WATER AT TU LIEM INDUSTRIAL AREA BY AEROTEN TREATMENT SYSTEM

Cung Thị Ngọc Mai, Nghiem Ngọc Minh*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

The diversity of bacteria that are able to degradate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Tu Liem industrial wastewater before and after treatment by Aeroten is presented in this article by using PCR-DGGE technique. Under the acrylamide - denaturation gradient of 35% upto 65%, 16S rDNA of both culturable and unculturable bacteria are separated on 6% acrylamide/bis-acrylamide gel. The three most dominant and varied 16S rDNA bands picked from comparable gels (before and after treatment) were collected, re-amplified by PCR and sequenced. The obtained sequences revealed the high similarity to those of unculturable bacteria deposited on GenBank (NCBI). The 16S rDNA of strain BTL12.1 showed 91% similarity to that of *Flavobacterium* sp. W2A82 and CJRA42 strains isolated from pharmaceutical wastewater polluted with PAHs, uranium nitrate. The 16S rDNA of strain BTL12.7 showed 98% similarity to that of bacterium

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

Betaproteobacteria QEDN10AE08 isolated from sludge of anaerobic treatment, 98% to bacteria isolated from wastewater containing organic substances, 97% to PAHs-degradable bacterium *Thauera minoaromatica* S2. The 16S rDNA of BTL13.1 strain possessed 95% similarity to that of uncultured strain SmB39 isolated from UASB system, 94% to strain *Veillonella* sp. V26 that is able to degrade lipids, 92% to strains of 1429 and LM12-14), isolated from food producing company. The gene sequences of three mentioned strains were deposited in database NCBI as unculture bacteria under the accession number HM449084, HM449085, HM449086, respectively.

Keywords: DGGE, industrial wastewater, biodegradation, PAHs biodegradation, uncultured microbial diversity