

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

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

¹Viện Công nghệ Sinh học

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

TÓM TẮT

Trong chiến tranh Việt Nam, quân đội Mỹ đã sử dụng nhiều loại chất độc hóa học khác nhau và cho đến nay, một số căn cứ quân sự cũ ở miền Trung và Nam Việt Nam vẫn bị ô nhiễm nặng bởi các chất diệt cỏ chứa các nồng độ dioxin khác nhau. Các chất độc hóa học đã gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người và đa dạng sinh vật trong đó có vi sinh vật. Kích thích phân hủy sinh học của vi sinh vật bản địa đang được xem như là phương pháp kinh tế nhất và an toàn với môi trường. Trong quá trình phân hủy các chất ô nhiễm trong đất, vi khuẩn hiếu khí đóng vai trò rất quan trọng. Tuy nhiên, vi khuẩn nuôi cấy được ở điều kiện phòng thí nghiệm chỉ chiếm tỷ lệ rất nhỏ từ 0,01 đến 10% vi khuẩn ngoài tự nhiên. Gần đây, các kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên acid nucleic như gen 16S rRNA đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. Trong nghiên cứu này đa dạng vi khuẩn không phụ thuộc nuôi cấy từ 9 mẫu đất HDN1 đến HDN9 thu thập ở các vị trí có nồng độ chất độc hóa học và dioxin khác nhau tại căn cứ quân sự cũ ở sân bay Đà Nẵng đã được phân tích so sánh đoạn gen 16S rRNA dựa trên kỹ thuật đa hình cấu trúc sợi đơn (SSCP). Các mẫu đất khô HDN4 và HDN6 ở gần vị trí có độ ô nhiễm cao có độ đa dạng vi khuẩn thấp hơn so với các mẫu khác. Chưa thấy sự khác biệt về đa dạng vi khuẩn giữa mẫu HDN9 ở vị trí có nồng độ chất ô nhiễm thấp nhất (có cỏ mọc) và các mẫu có nồng độ chất ô nhiễm cao hơn (HDN1 đến HDN8). Bốn mươi sáu dòng từ gel SSCP đã được đọc trình tự và so sánh. Cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong đất nhiễm bao gồm các lớp *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, α , β và γ -*Proteobacteria*. Vi khuẩn phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T thuộc chi *Burkholderia* và vi khuẩn thuộc họ *Burkholderiaceae* dường như chiếm ưu thế trong tất cả chín mẫu đất nhiễm. Một số vi khuẩn đất như *Frateriella*, *Nevsia*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* và các vi khuẩn ưa acid như *Acidocella*, *Acidiphillum* và *Acidobacterium* cũng đã được phát hiện.

Từ khóa: Chất diệt cỏ, đa dạng vi sinh vật, 16S rRNA, kích thích sinh học, SSCP

MỞ ĐẦU

Trong khoảng thời gian 10 năm từ 1961 đến 1971 quân đội Mỹ đã phun, rải khoảng 100 triệu lít thuốc diệt cỏ chứa gần 1080 kg dioxin xuống nhiều vùng ở miền Trung và Nam Việt Nam (Stellman *et al.*, 2003). Một số nghiên cứu của Việt Nam và quốc tế cho thấy một số “điểm nóng” trong đó có sân bay Đà Nẵng cũng như Biên Hoà vẫn còn bị ô nhiễm nặng các chất độc hóa học này. Đặc biệt 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin) chiếm tới trên 90% tổng độ độc trong các mẫu tại sân bay Đà Nẵng. 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) và 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) hai thành phần chủ yếu của các chất diệt cỏ có hàm lượng rất lớn lên tới hàng vài trăm nghìn đến vài triệu $\mu\text{g/kg}$ đất (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2004). Để loại bỏ các chất ô nhiễm này, một số phương pháp khử độc các chất độc hóa học như lý, hóa và sinh học đã được tiến hành. Trong đó kích

thích phân hủy sinh học các chất ô nhiễm bởi tập đoàn vi sinh vật bản địa được quan tâm đặc biệt do giá thành hạ và an toàn với môi trường. Phương pháp này đã được áp dụng thành công xử lý ô nhiễm dầu ở Việt Nam. Tuy nhiên, để ứng dụng thành công và triển khai rộng với các điểm ô nhiễm chất độc hóa học cần thiết có các điều tra về tập đoàn vi sinh vật bản địa. Các công bố cho thấy 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 *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2004). Hiện nay nhiều kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phân tích acid nucleic như gen 16S rRNA trong đó có phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn của gen 16S rRNA (SSCP-single strand conformation polymorphism) 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. ở 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. Sự cuộn xoắn khác nhau dẫn đến hình dạng cấu trúc khác nhau, di chuyển khác nhau và sẽ được phân tách trong điện di trên gel polyacrylamid. Do không cần mỗi gần kẹp GC nên kỹ thuật này không đòi hỏi gradient gel, hoặc các thiết bị đặc biệt. SSCP đường như đơn giản và không phức tạp hơn so với kỹ thuật điện di gel trên dải biến tính bởi hóa chất (DGGE) và nhiệt độ (TGGE) (Schwieger, Tebbe, 1998). Mục đích của nghiên cứu này là phân tích đa dạng vi khuẩn trong các mẫu đất nhiễm chất độc hóa học tại sân bay Đà Nẵng bằng ứng dụng kỹ thuật SSCP.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chín mẫu đất nhiễm chất độc hóa học tại sân bay Đà Nẵng được lấy ở 8 điểm có nồng độ chất độc hóa học khác nhau và được ký hiệu từ HDN1 đến HDN9. Mẫu HDN9 được lấy ở vị trí có cỏ mọc và nồng độ chất ô nhiễm thấp hơn. Các mẫu đất được lấy 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). Cặp mồi Com1 (5'- CAG CAG CCG CGG TAA TAC -3') và Com2 (5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3') được dùng để nhân đoạn gen 16S rRNA khoảng 400 bp trong vùng V4 đến V5. Mỗi Com2 được phosphoryl hóa ở đầu 5'. Hỗn hợp 50 µl phản ứng PCR bao gồm 5 µl đệm Taq PCR 10X, 1 µl dNTPs 12,5 mM, 2,5 µl mỗi mồi Com1 hoặc Com2 10 µM, 0,4 µl Taq polymerase (5 đơn vị/µl), 2 - 10 µl DNA tổng số. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: 94°C - 4 phút; 35 chu kỳ (94°C - 1 phút, 50°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 sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 2% và quan sát dưới tia UV.

PCR-SSCP

Sản phẩm PCR được làm sạch bởi kit của hãng QIAGEN và tiến hành cắt sợi đơn có mồi Com2 bằng enzyme lambda exonuclease ở 37°C trong 3 h. Tiếp tục làm sạch sản phẩm PCR sau khi đã được cắt

enzyme bằng kit của hãng QIAGEN và làm khô mẫu DNA trong thiết bị cô chân không (SpeedVac). Hòa DNA trong 6 µl chất màu SSCP (10 mM NaOH, 0,25% xylene cyanol [wt/vol], 0,25% bromophenol blue [wt/vol], 95% formamide [vol/vol]) 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 điện di mẫu DNA trên thiết bị Bio-Rad DCode™ được nối với thiết bị làm lạnh Lauda E100. Điện di được chạy ở 250 V (30 mA), 18 h, ở nhiệt độ 20°C trên gel MDE 0,625X, 20 cm × 20 cm × 0,75 mm trong đệm TBE 1X. Mẫu DNA được nhuộm bạc, cắt và thổi DNA 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 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 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 dựa trên các phần mềm Clustal X, Bioedit version 6.0.7, GENEDOC, NJPLOT, MEGA 3.1. Các trình tự đoạn gen 16S rRNA được đăng ký trên GenBank.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

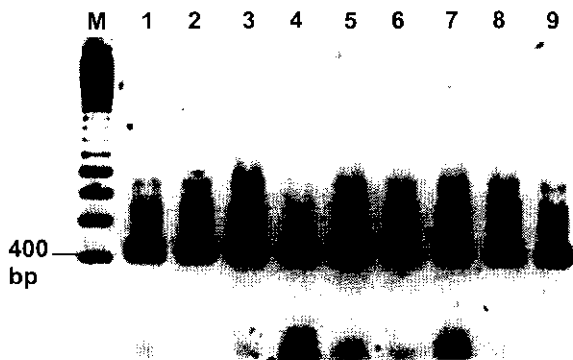
Nhân đoạn gen 16S rRNA từ các mẫu đất nhiễm

DNA tổng số của chín mẫu đất HDN1 đến HDN9 được tách từ 0,75 g mỗi mẫu theo kit Fast Prep Soil DNA Extraction. Kết quả nhân vùng V4 đến V5 của gen 16S rRNA (Hình 1) cho thấy đều thu được các băng DNA có kích thước khoảng 400 bp như tính toán lý thuyết từ DNA tổng số của 9 mẫu đất. Mẫu HDN4 và HDN6 có các băng DNA không đậm bằng các mẫu khác cũng có thể hai mẫu này đất khô hơn do đó số lượng vi sinh vật thấp hơn so với các mẫu khác (kết quả không trình bày ở đây).

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

Sản phẩm PCR được làm sạch, cắt sợi đơn có

mỗi phosphorylated 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 HDN4 và HDN6 ít đa dạng hơn so với các mẫu còn lại kết quả này cũng phù hợp khi phân tích điện di sản phẩm PCR trên gel agarose (Hình 1). Hai mẫu này ngoài đặc tính khô, còn nằm gần các điểm có độ ô nhiễm cao hơn (kết quả không trình bày ở đây). Ngoài ra chưa thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các mẫu đất ô nhiễm cao (HDN1 đến HDN8) và mẫu HDN9 có mức ô nhiễm thấp hơn (nơi có cỏ mọc).



Hình 1. Nhân đoạn gen 16S rRNA với DNA tổng số các mẫu đất nhiễm chất độc hóa học. 1-9 tương ứng với các mẫu đất từ HDN1 đến HDN9, M: thang DNA chuẩn 200 bp.

Trình tự nucleotide của 46 dòng (1HDN2 đến 53HDN7) tách từ gel SSCP được đăng ký trên GenBank với các số đăng ký từ DQ991255 đến DQ9912300.

Kết quả xác định trình tự các băng DNA lựa chọn trên gel cho thấy vi khuẩn trong 9 mẫu đất nhiễm có thể nằm trong các lớp *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, α , β và γ -*Proteobacteria* (Bảng 1, Hình 3). Vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* dường như chiếm ưu thế và có mặt trong tất cả các mẫu đất nghiên cứu. Kết quả xác định các dòng 4HDN1, 5HDN2, 6HDN3, 7HDN5, 8HDN8 và 10HDN9 cho thấy các dòng này có cùng độ di chuyển trên gel và có trình tự tương đồng rất cao (hơn 98%) với vi khuẩn chưa xác định 005-D thuộc họ *Burkholderiaceae*. Tương tự như vậy các dòng 16HDN5 và 19HDN6, 14HDN5, 18HDN6 và 20HDN7 hoặc 12HDN3, 15HDN5 và 22HDN8 đều di chuyển như nhau và mức tương đồng cao với vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia*. Ngoài ra một số dòng khác

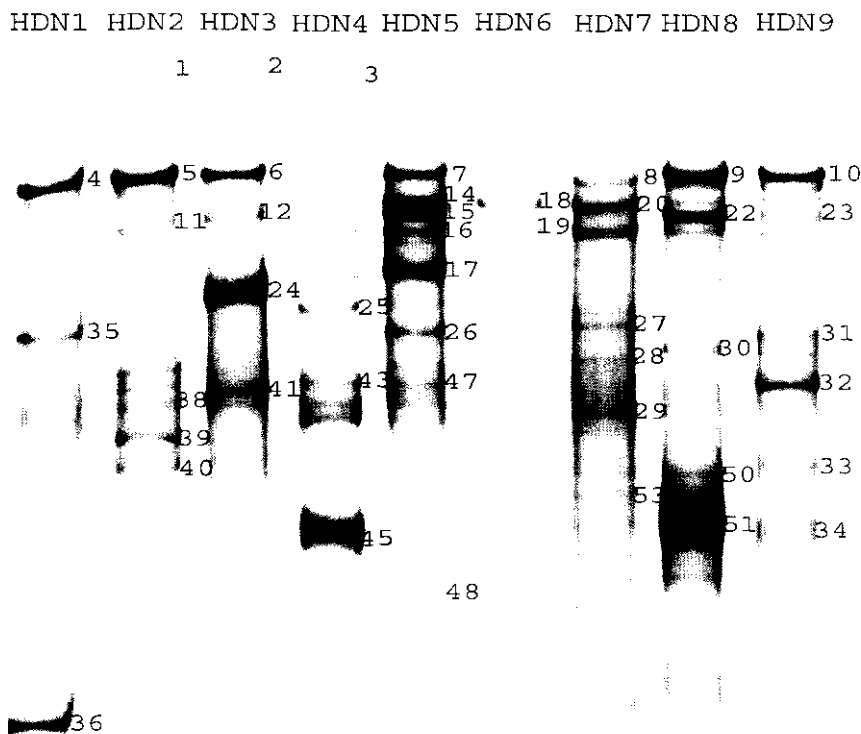
như 11HDN2, 3HDN4, 2HDN3 và 47HDN5 có quan hệ gần gũi với một số chi khác như *Ralstonia*, *Delftia*, *Thauera* và *Bradyrhizobium*.

Theo Itoh và đồng tác giả (2004), vi khuẩn sử dụng 2,4-D được xếp vào ba nhóm α , β và γ -*Proteobacteria* và bao gồm các chi như: *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* (*Wautersia*), *Rhodoferrax*, *Variovorax*, *Bradyrhizobium* và *Sphingomonas*. Khác với 2,4-D, 2,4,5-T khó phân hủy hơn, hiện không có nhiều công bố về phân hủy sinh học hợp chất này. Vi khuẩn sử dụng 2,4,5-T như nguồn carbon và năng lượng duy nhất được nghiên cứu đầy đủ nhất hiện nay là *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100 (tên cũ là *Burkholderia cepacia* AC1100) (Coenye *et al.*, 2004). Một vi khuẩn khác có khả năng khoáng hóa hoàn toàn 2,4-D và 2,4,5-T đó là *Nocardioideus simplex* 3E và đồng trao đổi chất 2,4,5-T của vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* PM (Travkin *et al.*, 1997; Mai *et al.*, 2001).

Đất tại căn cứ quân sự cũ ở sân bay Đà Nẵng bị ô nhiễm bởi các loại chất diệt cỏ khác nhau chứa hai thành phần chủ yếu là 2,4-D và 2,4,5-T và lượng nhỏ dioxin và các hợp chất tương tự (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2004). Kết quả so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy các dòng từ chín mẫu đất nhiễm đều có quan hệ gần gũi với các chi vi sinh vật sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T đã được công bố trên thế giới. Điều này chứng tỏ áp lực chọn lọc tự nhiên đối với tập đoàn vi sinh vật tại các mẫu đất này, chỉ những vi sinh vật nào có khả năng chịu được sự độc hại của các chất ô nhiễm và tham gia vào quá trình chuyển hóa các chất này mới có thể tồn tại được. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu khác trên thế giới. Các chất diệt cỏ và thuốc trừ sâu có ảnh hưởng trực tiếp đến thành phần nhóm, số lượng vi sinh vật và các quá trình phân hủy sinh học trong đất (Johnsen *et al.*, 2001). Công bố của Narain Rai (1992) cho thấy tập đoàn nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn không có sự sai khác rõ rệt 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. Syamsul Arif và đồng tác giả thông báo về hiệu quả ức chế mạnh của 2,4-D đối với ô xy hóa methan ở đất cát nông nghiệp (Syamsul Arif *et al.*, 1996). El Fantroussi và đồng tác giả kiểm tra ảnh hưởng của ba loại thuốc trừ sâu phenylurea đối với đa dạng vi khuẩn trong đất vườn cây ăn quả cho thấy số khuẩn lạc vi khuẩn giảm và hai dòng trên gel DGGE (vi khuẩn *Pseudomonas*) chỉ được tìm thấy ở đất đối chứng không xử lý

thuốc trừ sâu (El Fantroussi *et al.*, 1999). Nghiên cứu của Young (2006) cho thấy sau hơn 10 năm tác động của đất nhiễm chất da cam tại kho tồn chứa ở Mississippi-Mỹ đã làm tập đoàn vi sinh vật tăng gấp đôi nhưng đa dạng các loài nấm lại giảm đi. Nghiên cứu khác của Rice và đồng tác giả lại 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* (Rice *et al.*, 2005).

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*. Các thành viên của chi *Burkholderia* là các sinh vật đất quan trọng và tham gia vào hoạt động ở vùng quyền rễ cũng như phân hủy 2,4-D và các chất hóa học. Nogales và đồng tác giả khi đánh giá đa dạng vi sinh vật trong đất nhiễm PCB (polychlorobiphenyl-dạng hợp chất có cấu trúc tương tự dioxin) đã phát hiện vi khuẩn chi *Burkholderia* chiếm ưu thế trong tập đoàn vi sinh vật (Nogales *et al.*, 2001).



Hình 2. Điện di đồ SSCP 9 mẫu đất từ HDN1 đến HDN9, số ghi bên phải các băng DNA là tên của các dòng được xác định trình tự nucleotide.

Khác với 2,4-D và 2,4,5-T, dioxin và các hợp chất tương tự khó bị phân hủy hơn bởi vi sinh vật. Các con đường chuyển hóa dioxin và các hợp chất tương tự dưới tác động của enzyme dioxygenase của vi khuẩn hiếu khí diễn ra theo hai cơ chế (gắn hai oxi ở vị trí bên (lateral dioxygenation) 1,2 và đôi khi ở các vị trí 2,3 hoặc 3,4 của một nhân thơm và gắn hai oxi ở vị trí góc (angular dioxygenation) 4 và 4a của

nhân thơm liền kề cầu nối ete (ether) (Hiraishi *et al.*, 2003). So sánh đặc điểm phát sinh loài các chủng vi khuẩn phân hủy dioxin và các hợp chất tương tự bởi enzym dioxygenase cho thấy chúng thuộc các ngành (phyla) *Proteobacteria*, *Actinobacteria* và *Firmicutes*. Các chi vi khuẩn hiếu khí bao gồm *Novosphingobium*, *Porphyrobacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Erwinia*,

Pseudomonas, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Norcardioides*, *Rhodococcus*, *Terrabacter* (*Janibacter*), *Bacillus* (*Hiraishi et al.*, 2003). Trong số các dòng đại diện từ SSCP gel đã được đọc trình tự đã tìm thấy một số dòng có quan hệ gần với các chủng thuộc các chi như *Rhodococcus*, *Microbacterium*. Ngoài ra một số chủng sử dụng dibenzofuran và dioxin phân lập từ khu vực đất nhiễm chất độc hóa học đã được định tên như *Rhodococcus* sp. HDN3, *Terrabacter* (*Janibacter*) sp. DMA, *Paenibacillus* sp. Ao3, *Bacillus* sp. BU3, *Bacillus* sp. BDN6, *Streptomyces* sp. XKDN11, *Streptomyces* sp. XKDN12, *Streptomyces* sp. XKDN19, *Brevibacillus* sp. 13 (*Nguyễn Bá Hữu et al.*, 2007, Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2003 ; 2004, *Nghiêm Ngọc Minh et al.*, 2003). So với 2,4-D và 2,4,5-T, dioxin và các hợp chất tương tự trong đất nhiễm chất độc hóa học có hàm lượng nhỏ hơn nhiều tuy nhiên lại khó bị tác động bởi vi sinh vật. Như vậy, dưới tác động của các chất ô nhiễm qua hơn 40 năm đã tạo điều kiện chọn lọc tự nhiên đối với vi sinh vật, các vi sinh vật sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T có thể đã chiếm ưu thế hơn so với vi sinh vật sử dụng dioxin. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chỉ một số dòng đại diện từ gel SSCP được xác

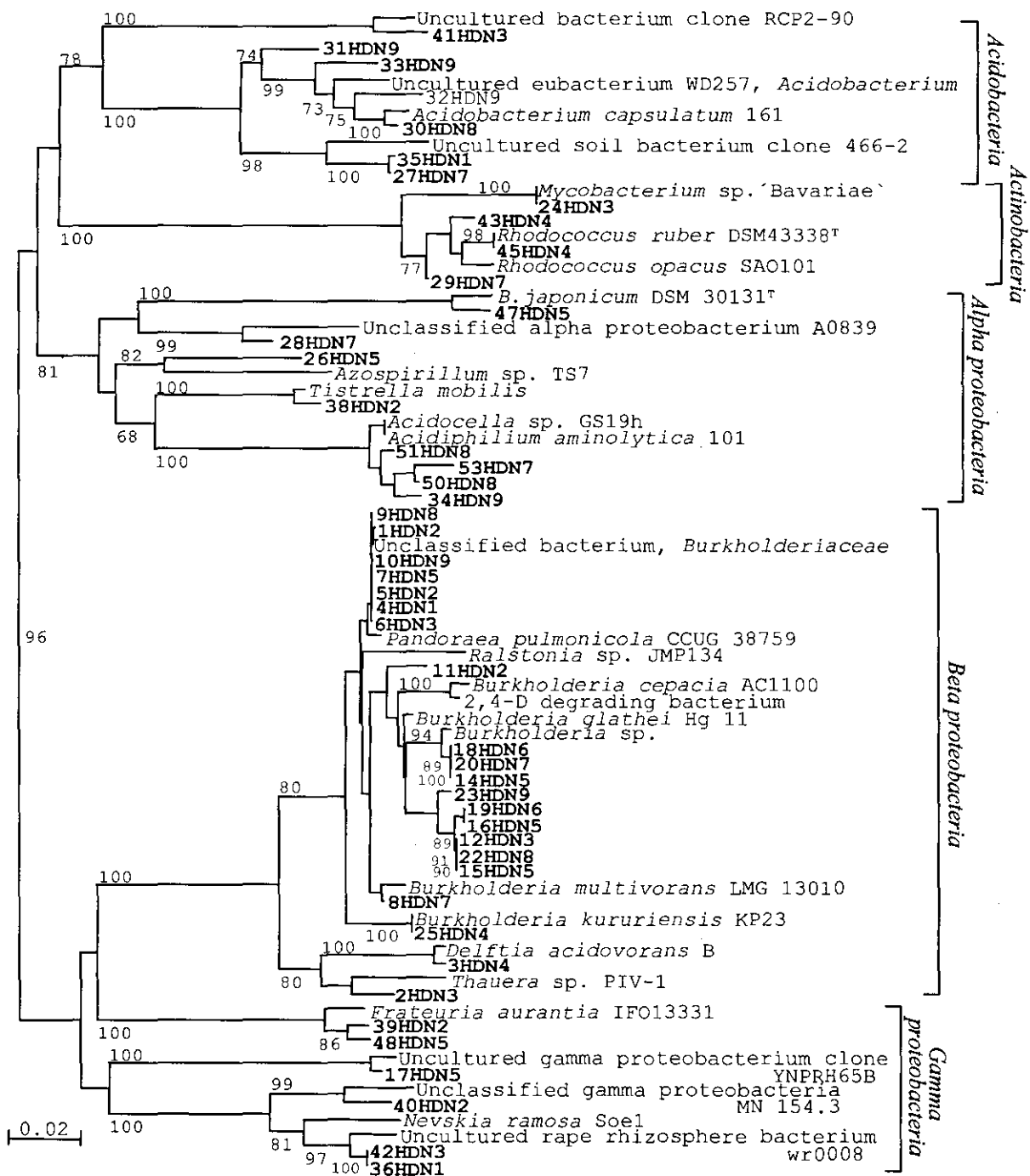
định trình tự nên thực tế một số chi vi khuẩn sử dụng dioxin và các hợp chất tương tự có thể vẫn chưa được phát hiện hết. Hơn nữa, quá trình phân hủy chất độc ngoài tự nhiên diễn ra rất phức tạp theo nhiều cơ chế khác nhau do đó nếu có sự kết hợp với các nghiên cứu khác về phân lập và nghiên cứu khả năng phân hủy chất độc thì bức tranh về đa dạng vi sinh vật (đa dạng loài, đa dạng di truyền và đa dạng chức năng) sẽ được sáng tỏ hơn.

Đất ở khu nhiễm độc có hàm lượng cát cao, thành phần sét thấp và pH thấp. Kết quả xác định trình tự các dòng đại diện đã cho thấy sự hiện diện của các nhóm vi sinh vật ưa acid như *Acidocella*, *Acidiphillum* và *Acidobacterium*. Vi khuẩn thuộc chi *Acidobacterium* rất khó phân lập và nuôi cấy được, tuy nhiên trình tự gen 16S rRNA của nhóm này đã được tìm thấy trong nhiều loại đất trong tự nhiên (*Tiedje et al.*, 1999; *Sait et al.*, 2006). Ngoài ra trong nghiên cứu này còn phát hiện một số dòng có mức tương đồng cao với các nhóm vi khuẩn đất như: *Frateruria*, *Nevsia*, *Bradyrhizobium* và *Azospirillum* (Bảng 1, Hình 3). Tuy nhiên, hiện nay vai trò của các vi khuẩn ưa acid và các nhóm vi khuẩn đất khác trong quá trình phân hủy các chất độc vẫn chưa được làm sáng tỏ.

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 đã công bố		
		Lớp	Vi khuẩn gần gũi nhất	% tương đồng
27HDN7	DQ991279	Acidobacteria	Uncultured soil <i>Acidobacteriaceae</i> bacterium 1496-2	65,5
30HDN8	DQ991282		<i>Acidobacterium capsulatum</i> 161	91,3
31HDN9	DQ991283		Uncultured <i>Acidobacteriaceae</i> bacterium WD257	79,4
32HDN9	DQ991284		Uncultured forest soil bacterium, <i>Acidobacterium</i>	88,5
33HDN9	DQ991285		Bacterium Ellin310	82,4
35HDN1	DQ991287		Uncultured soil <i>Acidobacterium</i> 466-2	76,6
41HDN3	DQ991292		Uncultured bacterium RCP2-90	62,1
24HDN3	DQ991276	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i> sp. 'Bavariae'	100,0
29HDN7	DQ991281		<i>Micromonospora</i> sp. IM-1078	87,4
43HDN4	DQ991294		<i>Rhodococcus fascians</i> D188	84,7
45HDN4	DQ991295		<i>Rhodococcus opacus</i> M213	97,7

26HDN5	DQ991278	<i>Azospirillum</i> sp. TS7	71,4
28HDN7	DQ991280	Alpha proteobacterium A0839	85,3
34HDN9	DQ991286	<i>Acidocella</i> sp. GS19h	94,9
38HDN2	DQ991289	<i>Tistrella mobilis</i>	99,0
47HDN5	DQ991296	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> BR3262	83,2
50HDN8	DQ991298	<i>Acidocella facilis</i> ATCC 35904 ^T	92,6
51HDN8	DQ991299	<i>Acidocella</i> sp. St1-2	96,6
53HDN7	DQ991300	<i>Acidiphilium aminolytica</i> 101 ^T	92,9
1HDN2	DQ991255	Unclassified <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 005-D	91,5
2HDN3	DQ991256	Unclassified <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 005-D	100
3HDN4	DQ991257	<i>Delftia acidovorans</i> B	99,5
4HDN1	DQ991258	Unclassified <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 005-D	98,7
5HDN2	DQ991259	Unclassified <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 005-D	98,0
6HDN3	DQ991260	Unclassified <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 005-D	98,0
7HDN5	DQ991261	Unclassified <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 005-D	98,7
8HDN7	DQ991262	2,4-D-degrading <i>Burkholderiaceae</i> bacterium TFD6	95,5
9HDN8	DQ991263	Unclassified <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 005-D	98,7
10HDN9	DQ991264	Unclassified <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 005-D	98,0
11HDN2	DQ991265	<i>Burkholderia cepacia</i> LMG 12615	100,0
12HDN3	DQ991266	<i>Burkholderia glathei</i> Hg 5	92,8
14HDN5	DQ991267	<i>Burkholderia</i> sp. S2.1	98,4
15HDN5	DQ991268	<i>Burkholderia caryophylli</i> ATCC 25418 ^T	92,6
16HDN5	DQ991269	<i>Burkholderia caryophylli</i> ATCC 25418 ^T	92,5
19HDN6	DQ991271	<i>Burkholderia caryophylli</i> ATCC 25418 ^T	92,1
18HDN6	DQ991272	<i>Burkholderia</i> sp. A6.2	94,2
20HDN7	DQ991273	<i>Burkholderia</i> sp. A6.2	96,6
22HDN8	DQ991274	<i>Burkholderia caryophylli</i> ATCC 25418 ^T	91,9
23HDN9	DQ991275	<i>Burkholderia graminis</i> C4D1M ^T	84,0
25HDN4	DQ991277	<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23T	100,0
17HDN5	DQ991270	<i>Gammaproteobacterium</i> Ellin5264	93,8
36HDN1	DQ991288	Uncultured rape rhizosphere bacterium wr0008	91,7
39HDN2	DQ991290	Arsenic resistant soil bacterium 7-03	92,6
40HDN2	DQ991291	Gamma proteobacterium MN 154.3	72,5
42HDN3	DQ991293	Uncultured rape rhizosphere bacterium wr0008	91,7
48HDN5	DQ991297	<i>Fulvimonas soli</i> LMG 19981 ^T	93,2



Hình 3. Cây phát sinh loài một số dòng tách từ gel SSCP 9 mẫu đất nhiễm chất độc hoá học tại Đà Nẵng và các chủng vi khuẩn đại diện trên GenBank. Số Bootstrap lớn hơn 70 được ghi ở các nhánh. Thước đo phản ánh sự sai khác của 2 nucleotide trên 100 nucleotide so sánh.

KẾT LUẬN

Dựa trên phân tích vùng V4 đến V5 của gen 16S rRNA bằng kỹ thuật SSCP đã đánh giá được mức độ đa dạng tập đoàn vi khuẩn trong 9 mẫu đất của khu nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng. Các mẫu đất khô hơn (HDN4 và HDN6), gần vị trí có độ ô nhiễm cao có mức đa dạng thấp hơn so với các mẫu còn lại. Chưa có sự khác biệt về đa dạng vi khuẩn giữa mẫu HDN9 ở vị trí có nồng độ chất ô nhiễm thấp nhất (có cỏ mọc) và các mẫu có nồng độ chất ô nhiễm cao hơn (HDN1 đến HDN8). Cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong đất nhiễm bao gồm các lớp *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, α , β và γ -*Proteobacteria*. Vi khuẩn phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T thuộc chi *Burkholderia* và vi khuẩn thuộc họ *Burkholderiaceae* dường như chiếm ưu thế trong tất cả chín mẫu đất nhiễm. Một số vi khuẩn đất như *Frateuria*, *Nevsia*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* và các vi khuẩn ưa axit như *Acidocella*, *Acidiphillum* và *Acidobacterium* cũng đã được phát hiện.

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

- 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.
- Đặng Thị Cẩm Hà, Nguyễn Đương Nhã, Nguyễn Ngọc Minh, Nguyễn Thành Đức (2003) Phân loại xạ khuẩn XKDN11 sử dụng dibenzofuran, hydrocarbon thơm đa nhân phân lập từ đất nhiễm chất độc hóa học. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(3): 377-386.
- Đặng Thị Cẩm Hà, Phạm Hữu Lý, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thị Đệ, Nguyễn 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. 2004. 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.
- El Fantroussi S, Verschuere L, Verstratete W, Top EM (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial community estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl Environ Microbiol* 65: 982-988.
- Hiraishi A (2003) Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilisation in bioremediation. *Microb Environ* 18: 105-123.
- Itoh K, Tashiro Y, Uobe K, Kamagata Y, Suyama K, Yamamoto H (2004) Root nodule *Bradyrhizobium* spp. Harbor *tdaA* and *cdaA*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Appl Environ Microbiol* 70: 2110-2118.
- Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils- a review. *Biol Fertil Soils* 33: 443-453.
- 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.
- Mai P, Stig Jacobsen O, Aamand J (2001) Mineralization and co-metabolic phenoxyalkanoic acid herbicide by a pure bacteria culture isolated from an aquifer. *Appl Environ Microbiol* 56: 486-490.
- 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.
- Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Đương Nhã, Đặng Thị Cẩm Hà (2004) Phân loại chủng vi sinh vật XKDN13 từ đất bị nhiễm chất độc hóa học. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(1): 125-132.
- Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2007) Xác định gen mã hóa dioxxygenaza từ chủng vi khuẩn phân hủy dibenzofuran *Terrabacter* sp. DMA phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng. *Tạp chí Sinh học* 29(3): 83-89.
- Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R, Timmis 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.

Sait M, Davis KER, Janssen PH (2006) Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl Environ Microbiol* 72: 1852-1857

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 Ecology* 13: 109-122.

Travkin VM, Jadan AP, Briganti F, Scotzafava A, Golovleva LA (1997) Characterisation of an intradiol dioxygenase involved in the biodegradation of the chlorophenoxy herbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *FEMS Lett* 407: 69-72

Trevors JT (1996) Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. Water, air, and soil pollution 101: 45-67.

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 THE BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE IN TOXIC CHEMICAL CONTAMINATED SOIL BASED ON ANALYSIS OF SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM OF 16S rRNA GENE

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

¹Institute of Biotechnology, Hanoi, Vietnam

²Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

SUMMARY

Several toxic chemicals were sprayed by the US Army during Vietnam War and until now some former military bases in Middle and South Vietnam have been polluted by these toxicants that contaminated with varying levels of dioxin. These toxic chemicals have hazardous effect to humans and biological diversity, including microorganisms. Biostimulation of indigenous microorganisms to degrade contaminants seems to be a cost effective and environmentally safe method of bioremediation. In soil, aerobic bacteria play a very important role in biodegradation process to contaminants. However, bacterial population which can be cultured by standard laboratory conditions is only 0.01 to 10% of bacterial community in the nature. In this study, nine soil samples containing various concentrations of toxic chemicals and dioxin were collected from different sites of former military base in Danang, and culture independence bacterial diversity was analyzed based on single strand conformation polymorphism (SSCP) of 16S rRNA gene. Dry soil samples HDN4 and HDN6 located near the highly contaminated sites showed less diversity than those collected at the other sites. There is no significant difference in bacterial diversity between lower contaminated sample HDN9 where grass can grow and eight higher contaminated samples HDN1 to HDN8. 46 DNA clones excised from SSCP gel were sequenced and compared. Microbial community structure in these soils is identified to belong to the classes of *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, α , β and γ -*Proteobacteria*. 2,4-D and 2,4,5-T degrading bacteria in the

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

genus *Burkholderia* and the family *Burkholderiaceae* seem to be dominant in all of the nine contaminated soil samples. Several soil bacteria such as *Frateuria*, *Nevsia*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and other acidiphilic bacteria *Acidocella*, *Acidiphillum* and *Acidobacterium* were also detected.

Keywords: *Biostimulation, herbicides, microbial diversity, 16S rRNA, SSCP*