

# XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG Bùn HỒ KHU VỰC NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN TẠI SÂN BAY ĐÀ NẴNG BẰNG KỸ THUẬT PCR-DGGE

NGUYỄN BÁ HỮU, ĐÀM THÚY HÀNG, ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

## 1. MỞ ĐẦU

Chiến tranh Việt Nam đã qua đi hơn 30 năm, tuy nhiên hậu quả của nó vẫn còn ảnh hưởng đến xã hội và môi trường của nước ta như ô nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại các căn cứ quân sự cũ trước đây quân đội Mỹ đã sử dụng. Hiện nay, không những đất mà cả bùn hồ trong khu vực bãi rửa máy bay và kho chứa tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng vẫn bị ô nhiễm các chất diệt cỏ chứa dioxin [2]. Một số phương án khử độc đất nhiễm đã và đang được triển khai, trong đó khử độc bằng công nghệ sinh học đã thu được các kết quả khả quan [2]. Khử độc bùn hồ nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin bằng công nghệ phân hủy sinh học là công nghệ triển vọng đang được các nhà khoa học và công nghệ quan tâm nghiên cứu. Một trong các yêu cầu để công nghệ thành công đó là đánh giá tập đoàn vi sinh vật trong các mẫu ô nhiễm cần khử độc. Các phương pháp dựa trên nuôi cấy thường chỉ xác định được một phần nhỏ tập đoàn vi khuẩn tồn tại ở ngoài tự nhiên. Hiện nay, để đánh giá chính xác mức độ đa dạng vi sinh vật, nhiều kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên phân tích gien mã hóa 16S rARN như kỹ thuật PCR kết hợp DGGE (điện di trên gel với dải nồng độ chất biến tính) đang được ứng dụng rộng rãi nghiên cứu sinh thái học [8 - 10, 12]. Trong nghiên cứu này kỹ thuật PCR-DGGE được sử dụng để đánh giá sự có mặt của tập đoàn vi khuẩn không phụ thuộc nuôi cấy trong mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Mẫu bùn hồ

Mười ba mẫu bùn được lấy từ ba hồ A, B và C [8]. Hai mẫu B1, B2 được lấy ở hồ B và mẫu C1 được lấy ở hồ C ở thời điểm 3/2007. Đây là hai hồ không nhận trực tiếp nguồn nước chảy từ bãi nhiễm nặng chất diệt cỏ chứa dioxin ở khu vực sân bay Đà Nẵng. Hồ A là hồ tiếp nhận trực tiếp nguồn nước từ khu vực bãi nhiễm. Năm mẫu bùn A1-A5 ở hồ A được lấy ở thời điểm 1/2007 và năm mẫu A6-A10 được lấy ở thời điểm 3/2007. Nồng độ dioxin trong một số mẫu lấy ở hồ B và C không cao, tuy nhiên ở hồ A trong khoảng 10.000 ppt [2].

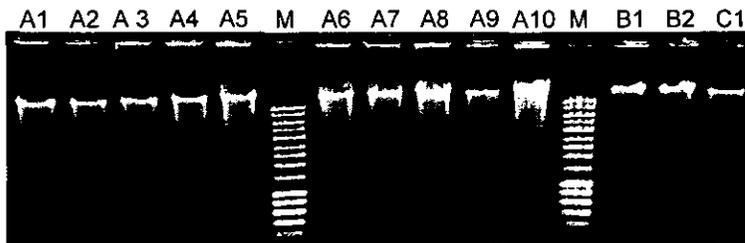
### 2.2. Xác định tập đoàn vi khuẩn không phụ thuộc nuôi cấy bằng kỹ thuật PCR-DGGE

Tách chiết và làm sạch ADN của 13 mẫu bùn hồ A, B và C theo mô tả ở UltraClean Soil DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc). Đoạn gien vùng V3 mã hóa 16S rARN của vi khuẩn được nhân lên nhờ kỹ thuật PCR với ADN tổng số mẫu bùn và cặp mồi 341F (GC) và 518R. Tiếp theo, 50  $\mu$ l sản phẩm PCR được tra vào các giếng trên gel DGGE 6% acrylamit, 0,1% bisacrylamit với dải nồng độ chất biến tính 20% - 70% urea/formamit. Mẫu ADN được

điện di trên gel DGGE, nhuộm và chụp ảnh. ADN thô từ các băng ADN trên gel được PCR lại với cặp mồi 341F và 518R, xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rARN và dựng cây phát sinh loài theo như mô tả trước đây [8]. Các số liệu thu thập được xử lý bằng chương trình NTSYSpc để tính ma trận tương đồng giữa các đôi mẫu. Các mẫu được xử lý tiếp trong NTSYS-SIMQUAL (phần mềm NTSYSpc2.0) và được biểu hiện trên cây thể hiện quan hệ di truyền giữa các mẫu. Các trình tự đoạn gen 16S rARN được đăng kí trên GenBank.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tách chiết ADN tổng số và nhân đoạn gen vùng V3 mã hóa 16S rARN tập đoàn vi khuẩn trong các mẫu bùn hồ

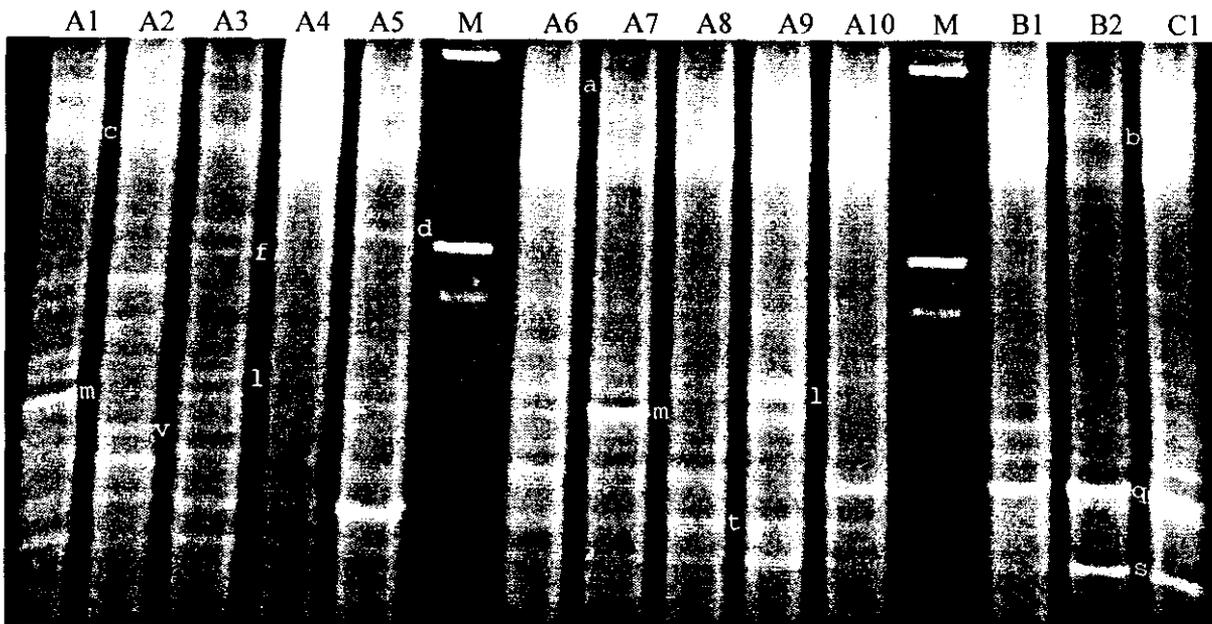


Hình 1. Điện di đồ ADN tổng số 13 mẫu bùn hồ tại sân bay Đà Nẵng  
M-thang ADN chuẩn Smart 200 bp (Eurogentec)

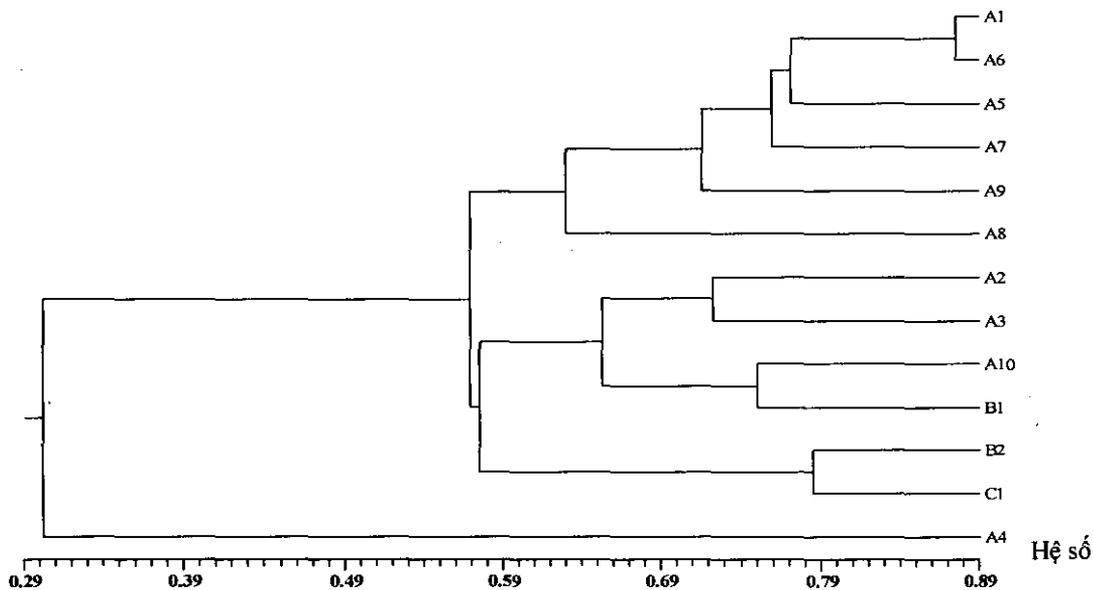
Kết quả ở hình 1 cho thấy, sản phẩm ADN tổng số từ 13 mẫu bùn của các hồ A, B và C có độ tinh sạch, không lẫn ARN và ít đứt gãy. Hiện nay, cặp mồi 341F và 518R được sử dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu để nhân vùng V3 đoạn gen mã hóa 16S rARN ở nhiều nhóm vi khuẩn khác nhau. Sản phẩm PCR nhân được từ ADN tổng số các mẫu bùn và cặp mồi 314F và 518R đều có kích thước khoảng 200 bp như tính toán lí thuyết.

#### 3.2. Phân tích cấu trúc tập đoàn vi khuẩn không phụ thuộc nuôi cấy trong bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin bằng kĩ thuật DGGE

Kĩ thuật DGGE được sử dụng trong nhiều nghiên cứu đa dạng vi sinh vật để tách riêng từng đoạn ADN trong hỗn hợp các đoạn ADN có cùng kích thước nhưng khác nhau về trình tự nucleotit [8, 11 - 12]. Kết quả ở hình 3 cho thấy, tập đoàn vi khuẩn khá đa dạng trong các mẫu bùn hồ. Nhìn chung các mẫu ở hồ A có mức đa dạng vi khuẩn lớn hơn so với hai hồ B và C. Năm mẫu A1-A5 có số băng ADN dao động từ 14 - 17, năm mẫu A6-A10 có số băng ADN từ 9 - 16. Số băng ADN ở các mẫu B1, B2 và C1 tương ứng là 12, 12 và 13. Kết quả này cũng phù hợp với các công bố trước đây về đa dạng nhóm vi khuẩn khử loại clo và vi khuẩn khử sunphat trong ba hồ kể trên [7 - 8]. Mẫu bùn trong hai hồ B và C có hàm lượng cát cao hơn so với các mẫu trong hồ A, do đó có thể mật độ vi khuẩn và mức độ đa dạng tập đoàn vi khuẩn ở các hồ này thấp hơn so với ở hồ A. Tuy nhiên, cần có các khảo sát với số lượng mẫu lớn hơn trong các hồ B và C để có kết luận chính xác hơn về mật độ vi khuẩn cũng như cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong các hồ đó.



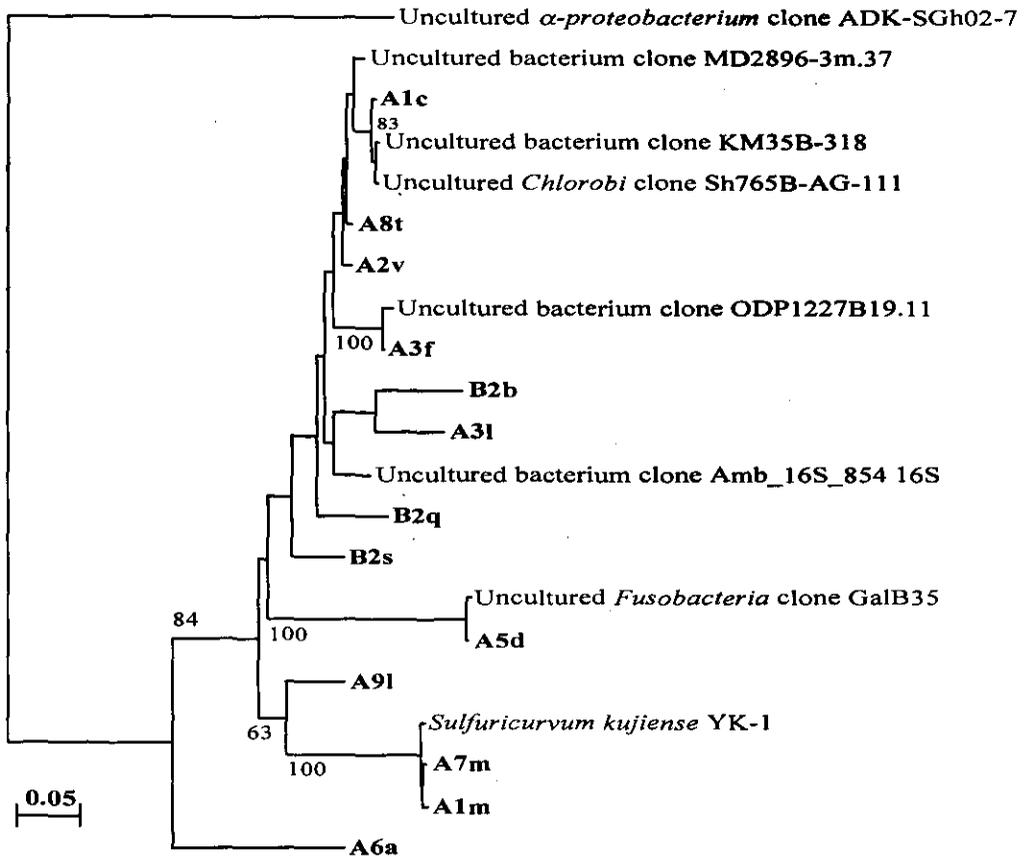
Hình 2. Fingerprint đoạn gen mã hóa 16S rARN tập đoàn vi khuẩn trên gel DGGE các mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin. M-thang ADN Smart 200 bp (Eurogentec). Các chữ ghi bên phải các băng ADN là kí hiệu các băng được cắt, thổi ADN và xác định trình tự nucleotit



Hình 3. Mối quan hệ di truyền giữa các đoạn gen mã hóa 16S rARN trong các mẫu bùn hồ

Kết quả ở hình 2 và hình 3 cho thấy có sự khác nhau về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong mẫu bùn các hồ và giữa hai đợt lấy mẫu. Tuy nhiên, so với các mẫu khác cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong hai mẫu A1 và A6 có quan hệ gần gũi cao nhất 87,5%, có thể hai mẫu này được lấy ở các vị trí gần nhau giữa hai đợt lấy mẫu ở hồ A. Mối quan hệ di truyền giữa tập đoàn vi khuẩn trong các mẫu bùn dao động từ 20% đến 87,5%. Một số băng ADN đậm nét như a, b, c, d, m, l,

q, t và s xuất hiện ở nhiều mẫu. Đây có thể là ADN của các vi khuẩn chiếm ưu thế trong các mẫu bùn hồ kể trên ở khu vực nhiễm chất chất diệt cỏ chứa dioxin.



Hình 4. Cây phát sinh loài các dòng tách từ gel DGGE và một số vi khuẩn đại diện trên GenBank. Số Bootstrap lớn hơn 60 được ghi ở các nhánh. Thước đo thể hiện 5 nucleotit khác nhau trên 100 nucleotit so sánh

Kết quả xác định trình tự một số băng ADN đại diện trong các mẫu bùn hồ cho thấy chúng có quan hệ gần gũi với nhiều dòng vi khuẩn không nuôi cấy, trong đó có vi khuẩn của các nhóm *alpha proteobacterium*, *Chlorobi* và *Chloroflexi*, *Sulfuricurvum*, *Fusobacteria*, *Nitrospiraceae* (bảng 1, hình 4). Ngoài ra, một số dòng trong nghiên cứu này có mức tương đồng cao với các dòng vi khuẩn chưa xác định được vị trí phân loại.

Vi khuẩn *Chlorobi* và *Chloroflexi* thuộc nhóm vi khuẩn lưu huỳnh màu xanh lá cây và vi khuẩn không lưu huỳnh màu xanh lá cây. Một số vi khuẩn của hai nhóm này và vi khuẩn khử loại clo *Dehalococcoides* được phát hiện trong các mẫu trầm tích một số sông nhiễm các chất hữu cơ chứa clo ở Nhật Bản, Đức và Hoa Kỳ [6, 12 - 13]. Nhiều dòng vi khuẩn không nuôi cấy trong các công thức xử lý khử độc đất nhiễm chất chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng bằng công nghệ phân hủy sinh học có mối tương đồng cao về trình tự đoạn gen mã hóa 16S rARN của vi khuẩn nhóm *Chloroflexi* [10]. *Sulfuricurvum kujiense* là loài vi khuẩn mới hóa tự dưỡng, kỵ khí tùy tiện, oxy hóa lưu huỳnh và được phân lập từ bể chứa ngậm dầu thô [14]. Vi khuẩn thuộc ngành *Fusobacteria* cũng được phát hiện trong trầm tích biển [1] và tham gia oxy

hóa sunphit liên quan đến khử arsen ở hồ Soda [4]. Một số vi khuẩn thuộc nhóm  $\alpha$ -*Proteobacteria* có khả năng sử dụng các chất diệt cỏ và dioxin [3, 5]. Vi khuẩn thuộc nhóm này cũng được tìm thấy trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng [9 - 10].

Bảng 1. Mối quan hệ giữa một số dòng tách từ gel DGGE và các vi khuẩn gần gũi

Dòng	Số đăng kí GenBank	Vi khuẩn gần gũi nhất và số đăng kí GenBank	% tương đồng
A1c	EU184880	uncultured <i>Chlorobi</i> bacterium; Sh765B-AG-111 (AJ519646)	96,4
A1m	EU184881	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> YK-1 <sup>T</sup> (AB053951)	100
A2v	EU184882	uncultured bacterium; MD2896-3m.37 (DQ996959)	89,6
A3f	EU184883	uncultured bacterium; ODP1227B19.11 (AB177059)	93,6
A3l	EU184884	uncultured bacterium; Amb_16S_854; EF018585	68,9
A5d	EU184885	uncultured <i>Fusobacteria</i> bacterium; GalB35 (AY193168)	100
A6a	EU184886	uncultured <i>proteobacterium</i> ; GASP-MB2S3_E01 (EF665235)	79,6
A7m	EU184887	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> YK-1 <sup>T</sup> (AB053951)	100
A8t	EU184888	uncultured bacterium; LaC15H82 (EF667747)	93,3
A9l	EU184889	uncultured <i>Nitrospiraceae</i> bacterium; KTS81 (AB127688)	98,5
B1b	EU184890	uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; ADK-SGh02-7 (EF520422)	100
B1q	EU184891	uncultured bacterium; PR_OTU-05 (EF165513)	100
B1s	EU184892	uncultured bacterium; c5LK553 (AM086136)	100

Kết quả phân tích DGGE và xác định trình tự một số dòng cho thấy sự đa dạng về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong các mẫu bùn hồ có mức độ ô nhiễm khác nhau ở khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở Đà Nẵng. Tuy nhiên, để có các kết quả và kết luận thêm về vai trò và mức đa dạng của các nhóm vi khuẩn được phát hiện bằng kỹ thuật sinh học phân tử trong mẫu bùn hồ cần có thêm các số liệu phân tích hóa học cũng như xác định thêm trình tự gen các băng ADN trong gel DGGE.

#### 4. KẾT LUẬN

Giữa hai đợt lấy mẫu, các hồ và các mẫu trong hồ cũng có sự khác nhau về tập đoàn vi khuẩn. Nhìn chung các mẫu ở hồ A có mức đa dạng vi khuẩn lớn hơn so với hai hồ B và C. Một số băng ADN đậm nét xuất hiện ở 1 hoặc nhiều mẫu bùn như a, b, c, d, m, l, q, t và s. Hệ số tương đồng di truyền nhóm vi khuẩn trong các mẫu bùn giao động từ 20 đến 87,5%.

Kết quả xác định trình tự một số băng ADN đại diện trong các mẫu bùn hồ cho thấy chúng có quan hệ gần gũi với nhiều dòng vi khuẩn không nuôi cấy, trong đó có vi khuẩn của các nhóm *Alpha proteobacterium*, *Chlorobi* và *Chloroflexi*, *Sulfuricurvum*, *Fusobacteria*, *Nitrospiraceae*.

Một số dòng trong nghiên cứu này có mức tương đồng cao với các dòng vi khuẩn chưa xác định được vị trí phân loại.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bhatt M., Zhao J. S., Monteil-Rivera F., Hawari H. - Biodegradation of cyclic nitramines by tropical marine sediment bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32** (2005): 261-267.
2. 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 - 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, 2005.
3. Hiraishi A. - Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilisation in bioremediation, *Microb Environ* **18** (2003): 105-123.
4. Hollibaugh J. T., Budinoff C., Hollibaugh R. A., Ransom B., Bano N. - Sulfide oxidation coupled to arsenate reduction by a diverse microbial community in a soda lake. *Appl Environ Microbiol* **72** (2006) 2043-2049.
5. Itoh K., Tashiro Y., Uobe K., Kamagata Y., Suyama K., Yamamoto H. - Root nodule *Bradyrhizobium* spp. harbor *tfdAα* and *cadA*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Appl Environ Microbiol* **70** (2004) 2110-2118.
6. Kyosuke S., Kozuma A., Ishizeki R., Iwatak K., Shimura M., Hayakawa T., Hoaki T., Nojiri H., Omori T., Yamane H., Habe H. - Detection of bacterial group within the phylum *Chloroflexi* and reductive dehalogenase-homologous genes in pentachlorobenzene-dechlorinating estuarine sediment from the Arakawa river, Japan. *Microb Environ* **21** (2006) 154-162.
7. Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Bá Hữu, Đàm Thúy Hằng, Nguyễn Việt Tiến, Đặng Thị Cẩm Hà - Xác định cấu trúc tập đoàn vi khuẩn khử sulphat trong mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng bằng kỹ thuật PCR-DGGE, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* **5** (2007) 523-528.
8. Nguyễn Bá Hữu, Đàm Thúy Hằng, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà - Xác định cấu trúc tập đoàn vi khuẩn khử loại clo *Dehalococcoides* trong mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng bằng kỹ thuật PCR-DGGE, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* **16** (2007a) 41-45.
9. Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, Dietmar H Pieper - Xác định cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong đất nhiễm chất độc hoá học dựa trên phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn gen 16S rRNA, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* **5** (2007b) 123-132.
10. Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, Nông Văn Hải, Dietmar H Pieper - Tính đa dạng của cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong quá trình xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở quy mô nhỏ hiện trường, *Tạp chí Công nghệ sinh học* **5** (2007c) 255-264.
11. Nguyễn Bá Hữu, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà - 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** (2006) 519-52.

12. Yoshida N., Takahashi N., Hiraishi A. - Phylogenetic characterization of a polychlorinated-dioxin-dechlorinating microbial community by use of microcosm studies, *Appl Environ Microbiol* **71** (2005) 4325-4334.
13. Young-Beom A., Haagblom M. M., Kerkhof L. J. - Comparison of anaerobic microbial communities from Estuarine sediments amended with halogenated compounds to enhance dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *FEMS Microbiol Ecol* **61** (2007) 362-371.
14. Yumiko K., Watanabe K. - *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity, *Inter J Syst Evolut Microbiol* **54** (2004) 2297-2300.

## SUMMARY

### CHARACTERISATION OF BACTERIAL DIVERSITY IN LAKE SEDIMENTS AT THE HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED AREA OF DANANG FORMER MILITARY BASE BY PCR-DGGE TECHNIQUE

PCR-DGGE technique was used for characterisation of bacterial community structure in sediments of three lakes A, B and C of the herbicide/dioxin contaminated area in Danang former military base. There were differences on bacterial diversity level between sediment samples and two sampling time. In general, bacterial diversity level in sediments of lake A was higher in comparison with sediments of two other lakes B and C. Several strong and sharp bands were appeared in one or some samples. The genetic coefficients of bacterial community in sediments are ranged from 20% to 87.5%. The sequence analysis of several representative DNA bands in lake sediments showed high similarity to some uncultured clones, including *Alphaproteobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Sulfuricurvum*, *Fusobacteria* and *Nitrospiraceae*. Moreover, some band excised from DGGE gel was also showed a high levels to other unclassified bacterial clones.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 10 năm 2007

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