

ASSESSMENT OF THE DIOXIN DEGRADABILITY OF SOME BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM CONTAMINATED SOIL AT A SO AIRBASE (HUE)

Le Minh Tri¹, Pham Kien Cuong², Nguyen Van Hoang², Nguyen Thi Tam Thu^{2*}

¹Academy of Military Science Technology, ²Institute of New Technology

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	17/01/2023	A So Airport is one of the hot spots for dioxin contamination because of the war. Biodegradation of dioxin isomers by microorganisms is an environmentally friendly method, capable of restoring contaminated land. In this study, from dioxin-contaminated soil samples at A So Airport (Thua Thien Hue), 9 strains of microorganisms capable of degrading persistent organic compounds were isolated. In which, 2 strains capable of degrading all 17 dioxin isomers at high concentrations were identified. The AS2 strain belongs to the genus <i>Klebsiella</i> and is named <i>Klebsiella</i> sp. AS2, whose registration number on GenBank is ON890383. The AS3 strain belongs to the genus <i>Bacillus</i> and is named <i>Bacillus</i> sp. AS3, whose registration number on GenBank is ON890397. The two strains were able to degrade 17 dioxin isomers with the efficiency from 1.47% to 100% after 30 days depending on the isomer type. Total toxicity in culture samples of 2 strains AS2 and AS3 decreased by 71.83% and 41.73%, respectively, with total initial toxicity of 3000 pg/ml. The AS2 and AS3 strains degraded 2,4-D with an efficiency of 68.61% and 52.32%, respectively, with an initial concentration of 200 ppm. Also with this concentration, the two strains degraded 2,4,5-T with the rates of 72.14% and 59.73%.
Revised:	27/02/2023	
Published:	28/02/2023	
KEYWORDS		
Dioxin		
Microbiology		
A So		
Degradation		
Contaminated soil		

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DIOXIN CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ ĐẤT Ô NHIỄM TẠI SÂN BAY A SO (HUẾ)

Lê Minh Trí¹, Phạm Kiên Cường², Nguyễn Văn Hoàng², Nguyễn Thị Tâm Thu^{2*}

¹Viện Khoa học và Công nghệ quân sự, ²Viện Công nghệ mới

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 17/01/2023	Sân bay A So là một trong các điểm nóng về ô nhiễm dioxin do hậu quả của chiến tranh. Phân hủy sinh học các đồng phân dioxin bởi vi sinh vật là phương pháp thân thiện môi trường, có khả năng phục hồi vùng đất ô nhiễm. Trong nghiên cứu này, từ các mẫu đất ô nhiễm dioxin tại sân bay A So (Thừa Thiên Huế), 9 chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ khó phân hủy được phân lập. Trong đó có 2 chủng có khả năng phân hủy cả 17 đồng phân dioxin ở nồng độ cao được định danh. Chủng AS2 thuộc chi <i>Klebsiella</i> và được đặt tên là <i>Klebsiella</i> sp. AS2, có mã số đăng ký trên GenBank là ON890383. Chủng AS3 thuộc chi <i>Bacillus</i> và được đặt tên là <i>Bacillus</i> sp. AS3, có mã số đăng ký trên GenBank là ON890397. Hai chủng có khả năng phân hủy 17 đồng phân dioxin với hiệu suất từ 1,47 % đến 100% sau 30 ngày tùy từng loại đồng phân. Tổng độ độc trong mẫu nuôi cấy 2 chủng AS2 và AS3 giảm tương ứng là 71,83% và 41,73% với tổng độ độc ban đầu là 3000 pg/ml. Chủng AS2 và AS3 phân hủy 2,4-D với hiệu suất 68,61% và 52,32% tương ứng với nồng độ 2,4-D ban đầu là 200 ppm. Cũng với nồng độ này, hai chủng phân hủy 2,4,5-T với tỷ lệ 72,14% và 59,73%.
Ngày hoàn thiện: 27/02/2023	
Ngày đăng: 28/02/2023	
TỪ KHÓA	
Dioxin	
Vi sinh vật	
A So	
Phân hủy	
Đất ô nhiễm	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7236>

* Corresponding author. Email: thu.n3t.cnm@gmail.com

1. Mở đầu

Dioxin là tên gọi chung của các đồng phân chứa clo có chứa vòng thơm, chúng bao gồm 75 đồng phân polychlorodibenzo-p-dioxin (PCDD) và 135 đồng phân polychlorodibenzofuran (PCDF). Dioxin là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất chất diệt cỏ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) và 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) [1]. Trong 10 năm (1961-1971) chiến tranh tại Việt Nam, khu vực sân bay A So nói riêng và toàn tỉnh Thừa Thiên Huế nói chung là nơi chịu ảnh hưởng của chất độc dioxin nặng nề. Toàn tỉnh Thừa Thiên Huế hiện có gần 16.000 người bị nhiễm chất độc da cam/dioxin, riêng huyện A Lưới có khoảng 5.000 người. Các kết quả khảo sát cơ bản xác định được khu vực ô nhiễm dioxin tại sân bay A So với diện tích khoảng 5 ha, chiều sâu ô nhiễm trung bình 0,7 m, tổng khối lượng đất ô nhiễm cần xử lý là 35.000 m³. Trong đó có khoảng 6,6 ha đất nhiễm có nồng độ ô nhiễm trên 200 ppt (mức độ rất nặng) [2]. Chất độc dioxin đã thấm sâu vào đất, làm nhiễm độc nguồn nước. Dioxin xâm nhập vào cơ thể người qua hít thở không khí, uống nước, ăn các loại thực phẩm, hoặc tiếp xúc qua da, nhưng chủ yếu là qua chuỗi thức ăn. Tại những vùng bị ô nhiễm, dioxin có trong đất, bùn, trầm tích và cũng có thể có ở phần củ, rễ, thân của các loài cây và trong một số động vật sống trong các ao hồ bị nhiễm dioxin nên con người dễ bị nhiễm dioxin do tiêu thụ nguồn thực phẩm này. Dioxin ảnh hưởng rất lớn đến con người và động thực vật. Trong cơ thể động vật và người, dioxin tích tụ chủ yếu trong mỡ và gan, người càng béo, dioxin tích tụ càng nhiều. Dioxin bị đào thải chủ yếu qua quá trình chuyển hóa ở gan - mật, qua phân và một phần nhỏ qua tiểu. Song các quá trình thải loại này xảy ra rất chậm nên có thể ảnh hưởng đến các thể hệ sau.

Dioxin là chất rất bền vững trong môi trường, được nước mưa di chuyển xuống ao hồ, tích tụ ở trong lớp bùn và trầm tích, từ đó nhiễm vào các thủy sinh vật (đặc biệt là cá, tôm, cua, ốc, trạch...) trở thành nguồn thực phẩm nguy hiểm với con người. Hiện nay, đã có nhiều biện pháp được áp dụng để xử lý chất diệt cỏ/dioxin bao gồm phương pháp vật lý, hóa học và sinh học [3], [4]. Trong đó phương pháp xử lý sinh học là phương pháp thân thiện với môi trường, kinh tế và có khả năng phục hồi các vùng đất ô nhiễm. Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh các vi sinh vật bản địa có khả năng phân hủy các hợp chất dioxin tại nơi có nồng độ cao như các chủng thuộc chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Peaenibacillus*... được phân lập tại sân bay Biên Hòa và Đà Nẵng có khả năng sử dụng các chất 2,4-D, 2,4,5-T là nguồn C duy nhất [3], [4]. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Tâm Thư đã chứng minh sự có mặt của rất nhiều chi vi khuẩn có mặt trong mẫu làm giàu tại mẫu xử lý dioxin từ đất nhiễm của sân bay Biên Hòa như *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Dehalococcoides*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*... [5] – [8]. Đối với đất bị ô nhiễm dioxin tại sân bay A So, Bộ Tư lệnh Hóa học đang xử lý kết hợp bằng biện pháp chôn lấp tích cực và phương pháp sinh học (sử dụng vi sinh vật) [2]. Trong nghiên cứu này, đất ô nhiễm dioxin tại sân bay A So được sử dụng để phân lập các vi sinh vật bản địa có khả năng phân hủy dioxin và so sánh với các chủng phân lập từ sân bay Biên Hòa, Đà Nẵng. Các chủng này cũng được đánh giá về khả năng phân hủy các hợp chất dioxin cũng như các chất diệt cỏ 2,4-D, 2,4,5-T nhằm chứng minh vai trò của vi sinh vật trong quá trình xử lý các hợp chất dioxin tại sân bay A So.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu đất ô nhiễm từ sân bay A So (16° 06'57,6" N, 107°19'30,7" E).

Dịch chiết đất do Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga cung cấp, có tổng độ độc khoảng 153.000 pg TEQ/ml.

Các hóa chất nuôi cấy vi sinh vật (khoáng, nguồn C, nguồn N), hóa chất để tách chiết DNA từ khuẩn lạc vi khuẩn, hóa chất nhân đoạn gen 16S rRNA của hãng Thermo, kit làm sạch sản phẩm PCR. Các thiết bị cần thiết bao gồm box cấy vô trùng, nồi khử trùng hơi nước, tủ ẩm, máy lắc, cân phân tích và các dụng cụ khác. Các thí nghiệm được thực hiện tại Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lấy mẫu đất

Loại bỏ lớp đất phủ bề mặt, rác, cành lá cây. Xác định 5 vị trí lấy mẫu theo dấu X, khoảng cách từ các đỉnh đến điểm trung tâm là 50 cm. Dùng xẻng đào sâu xuống độ sâu 15-20 cm. Trộn 5 mẫu lại với nhau, rây qua lưới thép để loại bỏ phần sỏi đá kích thước lớn đồng thời tăng độ đồng đều của mẫu. Cho đất vào túi ghép mí PP kích thước 14 x 20 cm, đã khử trùng để tránh nhiễm vi sinh vật (VSV), khối lượng mỗi mẫu khoảng 1 kg. Ghi nhãn, ký hiệu mẫu và cho vào thùng xốp chứa đá gel để duy trì nhiệt độ 0-4°C đến khi mang về Phòng thí nghiệm để phân tích.

2.2.2. Phân lập các vi sinh vật có khả năng phân hủy dioxin

Từ các mẫu đất thu thập được, các vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất dioxin được làm giàu bằng cách bổ sung 10% giống (từ các mẫu đất) và nuôi cấy trên môi trường khoáng chứa dịch chiết đất (DCĐ) với hàm lượng dioxin cao là nguồn C duy nhất. Sau 3 lần làm giàu liên tiếp, các bình nuôi được gạt đĩa trên môi trường thạch thường ở các nồng độ pha loãng khác nhau [4], [5]. Các vi khuẩn mọc trên đĩa thạch được làm sạch và cấy ra ống thạch nghiêng để giữ giống.

2.2.3. Tách DNA tổng số

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên đĩa thạch để tạo các khuẩn lạc riêng rẽ. Từ các khuẩn lạc, sinh khối vi khuẩn được lấy để tách DNA tổng số theo kit Genomic DNA Extraction. DNA tổng số thu được được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X. Các đoạn DNA tổng số đủ điều kiện được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen 16S rRNA.

2.2.4. Định danh vi sinh vật bằng giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Nhân đoạn gen 16S rRNA của chủng sạch: DNA tổng số được dùng để làm khuôn nhân đoạn gen 16S rRNA với các thành phần gồm primers (F/R), Tag polymerase, DNA, Buffer, dNTP, H₂O. Phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình 35 chu kỳ như mô tả trước đây [5], sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3'). Các sản phẩm PCR được làm sạch bằng kit làm sạch RNA. Sản phẩm sau khi làm sạch được gửi đi giải trình tự trên thiết bị Illumina. Sử dụng phần mềm Blast để so sánh trình tự trên ngân hàng gen và phần mềm Mega X để xây dựng cây phát sinh chủng loại. Các chủng được lựa chọn được đăng ký mã số trên ngân hàng gen NCBI [5].

2.2.5. Đánh giá khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ chứa clo/dioxin

Các chủng vi khuẩn c lựa chọn được nuôi cấy trên môi trường MSM có bổ sung DCĐ ở nồng độ khoảng 3000 pg/ml. Nuôi cấy lắc 200 v/p ở 37°C trong 30 ngày, sau đó lấy dịch nuôi cấy gửi đi phân tích tại Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga để xác định hàm lượng các đồng phân dioxin còn lại trong dịch nuôi. Làm song song mẫu đối chứng chỉ có DCĐ, không có VSV.

Các đồng phân của dioxin được phân tích trên thiết bị sắc ký khí Agilent 7890A ghép khối phổ phân giải cao AutoSpec Premier P792 với quy trình tham khảo US. EPA1613B. Chuẩn bị mẫu theo HD-PTD02; Phân tích mẫu theo HD-PTD06. Mẫu được thêm các chất nội chuẩn đánh dấu đồng vị ¹³C₁₂-PCDD/PCDF, chiết soxhlet với toluen. Thêm chất chuẩn làm sạch đánh dấu đồng vị ³⁷Cl₄-2,3,7,8-TCDD vào dịch chiết của mẫu. Làm sạch lần lượt bằng các dung dịch H₂SO₄ đặc, NaCl, KOH, NaCl; làm sạch trên “cột đa lớp” chứa silicagen, silicagen tẩm axit, silicagen tẩm kiềm. Phân đoạn PCDD/PCDF được tách trên cột than hoạt tính chuyên dụng, cột nhôm ôxít, thêm các chất chuẩn đánh dấu đồng vị ¹³C₁₂-BHDD xác định hiệu suất thu hồi.

2.2.6. Đánh giá khả năng phân hủy 2,4-D, 2,4,5-T

Nuôi cấy 2 chủng AS2 và AS3 trên môi trường DSM có bổ sung 2,4-D, 2,4,5-T với nồng độ 200 ppm trong 7 ngày trên máy lắc với tốc độ 200 v/p, ở 35°C. Dịch nuôi cấy sau 7 ngày được ly

tâm loại bỏ sinh khối và phân tích hàm lượng 2,4-D, 2,4,5-T trên máy HPLC tại khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên/Đại học Quốc gia Hà Nội.

3. Kết quả nghiên cứu

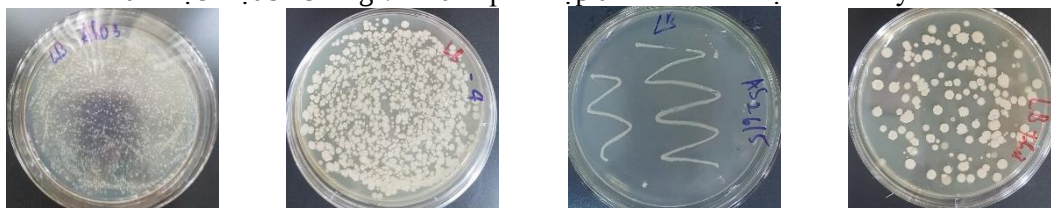
3.1. Phân lập và định danh vi sinh vật

Sau khi làm giàu 3 lần liên tiếp trên môi trường chứa DCĐ là nguồn C duy nhất, các mẫu được cấy gạt trên môi trường thạch LB để tách các khuẩn lạc riêng rẽ. Đánh giá khả năng sinh trưởng của từng chủng trên môi trường MSM chứa DCĐ (nồng độ 1.000 pg TEQ/ml). Chủng nào cho khả năng sinh trưởng cao (độ đục lớn khi đo ở bước sóng 600 nm) thì sẽ được lựa chọn để định danh và đánh giá khả năng phân hủy các chất hữu cơ POP. Kết quả đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy các hợp chất dioxin ở các mức độ khác nhau. Kết quả trình bày trên Bảng 1 cho thấy cả 9 chủng đều sinh trưởng trên môi trường MSM có bổ sung DCĐ. Tuy nhiên, 2 chủng AS2 và AS3 có khả năng sinh trưởng tốt hơn nên được lựa chọn để nghiên cứu tiếp.

Bảng 1. Khả năng sinh trưởng trên môi trường MSM chứa DCĐ của các chủng VSV

Tên chủng	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6	AS7	AS8	AS9
OD600 nm	0,62	1,18	1,25	0,68	0,71	0,75	0,86	0,77	0,82
Khả năng sinh trưởng	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++

Hình ảnh khuẩn lạc một số chủng vi khuẩn phân lập từ đất A So được trình bày trên Hình 1.



Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc một số chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu đất A So

3.2. Khả năng phân hủy các đồng phân độc của dioxin

Để đánh giá khả năng phân hủy các hợp chất dioxin, 2 chủng AS2 và AS3 được nuôi cấy trong môi trường MSM có chứa DCĐ, lắc trên máy lắc ở tốc độ 150 v/p trong 30 ngày ở 35°C. Kết quả về khả năng phân hủy 17 đồng phân độc của dioxin/furan của 2 chủng được trình bày trên Bảng 2.

Kết quả trình bày trên Bảng 2 cho thấy sau 30 ngày nuôi cấy, 2 chủng AS2 và AS3 đã phân hủy và chuyển hóa được 71,83% và 41,73% tổng độ độc trong mẫu so với mẫu đối chứng là 3.074,76 pg TEQ/ml. Mẫu đối chứng và các mẫu khác đều không phát hiện ra 1,2,3,7,8,9-HxCDF chứng tỏ đất sử dụng để tách chiết không có đồng phân này. Chủng AS2 phân hủy đồng phân 2,3,7,8-TCDF mạnh nhất là 93,63%, không phân hủy 1,2,3,7,8-PeCDF. Chủng AS3 phân hủy 100% 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF nhưng chỉ phân hủy 2,79% đồng phân 1,2,3,6,7,8-HxCDD; 7,39% 1,2,3,7,8,9-HxCDD. Hai đồng phân độc nhất là 2,3,7,8-TCDD và 1,2,3,7,8-PeCDD bị phân hủy và chuyển hóa 72,89% và 78,47% bởi chủng AS2 và 41,69%, 57,62% bởi chủng AS3. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây vì mẫu nghiên cứu có tổng độ độc không cao. Theo nghiên cứu của [6], hỗn hợp 5 chủng vi khuẩn phân hủy 59,1% 2,3,7,8-TCDD (tương đương 2.537 pg/g đất khô) sau 30 ngày nuôi cấy với nồng độ ban đầu 4.294 pg TEQ/g [6]. Nghiên cứu của Phùng Khắc Huy Chú cho thấy chủng nấm FBV40 phân hủy 44,7% đồng loại 2,3,7,8-TCDD với độ độc ban đầu 2000 ng TEQ/L (tương đương 2000 pg TEQ/ml) sau 8 ngày [9]. Theo Chen (2013), sau 6 tuần, việc kích thích các vi sinh vật bản địa

trong đất bằng cách bổ sung chất dinh dưỡng đã xử lý được gần như 100% OCDF và 97,75% HeCDF đã giảm, nhưng không suy giảm OCDD xảy ra trong vòng 12 tuần [10].

Bảng 2. Khả năng phân hủy của các đồng phân dioxin bởi 2 chủng AS2 và AS3

TT	Chất phân tích	Đối chứng	Chủng AS2		Chủng AS3	
		Nồng độ	Nđộ	H (%)	Nđộ	H (%)
1	2,3,7,8-TCDD	3.070,82	865,40	72,89	1790,6	41,69
2	1,2,3,7,8-PeCDD	2,06	0,43	78,47	0,873	57,62
3	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,14	0,05	66,23	0,064	54,29
4	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,43	0,40	7,32	0,418	2,79
5	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,23	0,15	36,48	0,213	7,39
6	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	3,45	1,19	65,37	1,245	63,91
7	OCDD	72,64	47,89	34,07	44,729	38,42
8	2,3,7,8-TCDF	16,55	1,06	93,63	1,486	91,02
9	1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,05	0,00	0,074	20,00
10	2,3,4,7,8-PeCDF	0,21	0,08	62,77	0,099	52,86
11	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,04	0,03	27,91	0,046	35,00
12	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,07	0,068	1,47	KPH	100
13	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,12	0,04	63,52	0,084	30,00
14	1,2,3,7,8,9-HxCDF	KPH	KPH	KPH	KPH	-
15	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,45	0,17	62,03	0,216	52,00
16	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,05	0,05	3,77	KPH	100
17	OCDF	0,39	0,28	28,68	0,248	36,41
Tổng độ độc (pg TEQ/ml)		3.074,76	866,06	71,83	1791,79	41,73

Theo công bố trước đây, khả năng phân hủy dioxin của các chủng là khác nhau theo các kiểu oxy hóa khác nhau như oxy hóa góc hay cạnh bên [10]. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tổng độ độc đã giảm 71,83 và 41,73% trong 1 tháng với nồng độ độc ban đầu khoảng 3000 pgTEQ/g đất (tương đương hiệu suất 73,49 và 42,65 pg/g/ngày). Trong nghiên cứu này mới chỉ đánh giá sự giảm tổng độ độc mà chưa đánh giá các hợp chất trung gian tạo thành. Tuy nhiên, việc giảm độ độc đến 71,83% (với chủng AS2) như vậy cũng làm cho các hợp chất tạo thành bớt độc hơn cho các vi sinh vật và cây trồng, cho phép các sinh vật khác trong đất có thể sinh trưởng và khoáng hóa dần các hợp chất này.

3.3. Khả năng phân hủy 2,4-D, 2,4,5-T của hai chủng vi khuẩn AS2 và AS3

Ngoài việc đánh giá khả năng phân hủy các đồng phân dioxin là các chất có độ độc cao thì việc đánh giá khả năng phân hủy 2,4-D, 2,4,5-T (là thành phần chính của chất diệt cỏ, vẫn tồn tại với nồng độ rất cao trong sân bay) của 2 chủng cũng được nghiên cứu. Kết quả về khả năng phân hủy, chuyển hóa các hợp chất là thành phần của chất diệt cỏ với nồng độ 200 ppm được trình bày trên Bảng 3.

Bảng 3. Khả năng phân hủy 2,4-D của 2 chủng AS2 và AS3

	Chủng AS2		Chủng AS3	
	Hàm lượng còn lại (ppm)	Hiệu suất phân hủy (%)	Hàm lượng còn lại (ppm)	Hiệu suất phân hủy (%)
2,4-D	62,78	68,61	95,36	52,32
2,4,5-T	55,72	72,14	80,54	59,73

Kết quả trên Bảng 3 cho thấy cả 2 chủng có khả năng phân hủy mạnh các chất là thành phần của chất diệt cỏ/dioxin với nồng độ 200 ppm. Sau 7 ngày, chủng AS2 đã phân hủy 68,61% 2,4-D và 72,14% 2,4,5-T. Chủng AS3 đã phân hủy 52,32% 2,4-D và 59,73% 2,4,5-T. Cả 2 chủng đều

có khả năng phân hủy 2,4,5-T mạnh hơn 2,4-D và chủng AS2 có hiệu suất phân hủy các thành phần chất diệt cỏ cao hơn chủng AS3. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu của La Thanh Phương [8] cho thấy chủng *Pseudomonas* sp. BDN15 có khả năng phân hủy 39,37% 2,4,5-T ở nồng độ 1000 ppm sau 5 ngày nuôi cấy. Chủng *Pseudomonas* sp. HR5.1 phân lập từ bioreactor xử lý đến 52% 2,4,5-T với nồng độ 200 ppm [7].

3.4. Định danh vi sinh vật

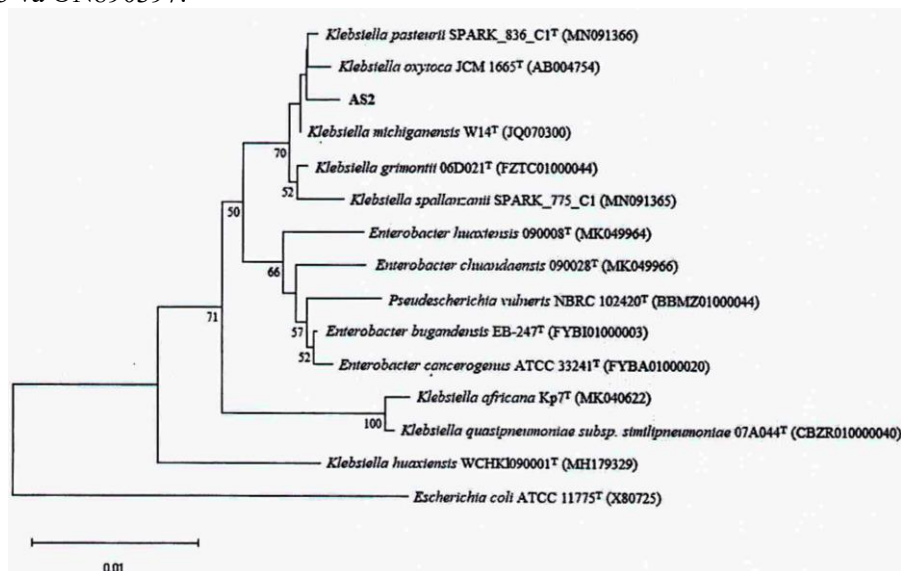
Hai chủng AS2, AS3 có khả năng phân hủy các chất là thành phần của chất diệt cỏ/dioxin phân lập từ sân bay A So được định danh bằng cách nhuộm Gram, quan sát hình thái tế bào và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA.

Kết quả nhận được cho thấy chủng AS2 thuộc loại Gram âm và chủng AS3 thuộc nhóm Gram dương (Hình 2). Cả 2 chủng đều có cấu tạo hình que ngắn (Hình 2).



Hình 2. Hình ảnh nhuộm Gram (1, 2) và hình thái tế bào (3, 4) của chủng AS2 và AS3

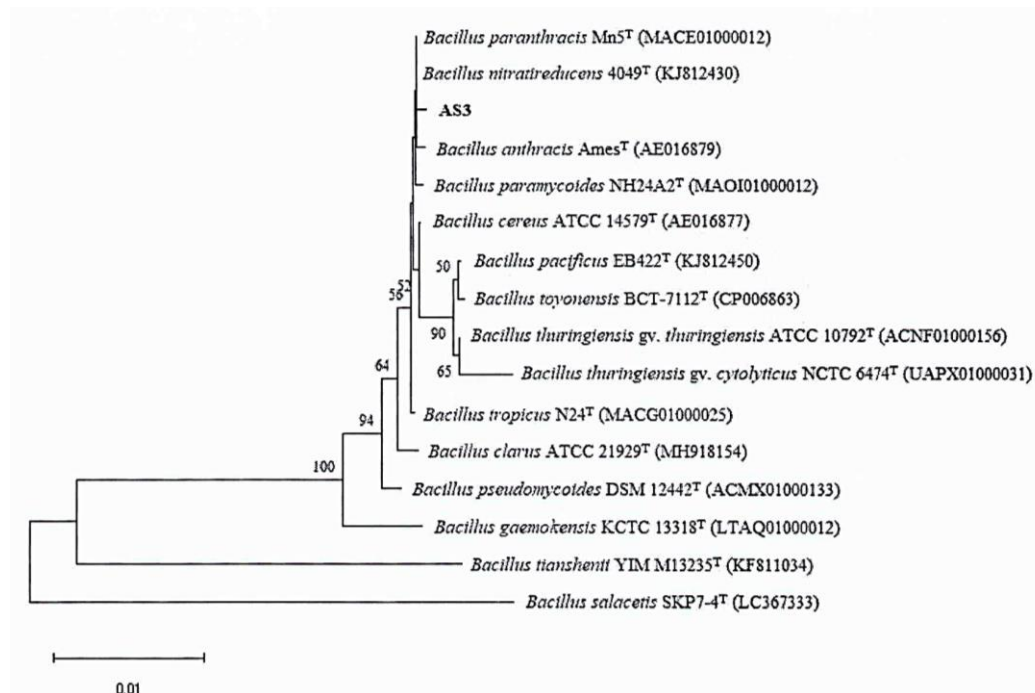
Trình tự các đoạn gen 16S rRNA sau khi xử lý loại nhiễu được so sánh trên ngân hàng gen để so sánh độ tương đồng với các chủng liên quan gần gũi. Kết quả cho thấy chủng AS2 tương đồng 99,51% với các chủng *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, JCM 1665, NBRC 102593 nên được đặt tên là *Klebsiella* sp. AS2. Chủng AS3 tương đồng 99,93% với các chủng *Bacillus tropicus* MCCC 1A01406, *B. nitratireducens* MCCC aA00732, *B. cereus* ATCC 14579, CCM 2010 và được đặt tên là *Bacillus* sp. AS3. Cả 2 chủng này được đăng ký trên GenBank với mã số tương ứng là ON890383 và ON890397.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng AS2 và các loài liên quan gần gũi; Giá trị bootstrap (%) dựa trên 1.000 lần lặp

Hai chủng AS2 và AS3 được xây dựng cây phân loại bằng phần mềm Mega X với phương pháp Neighbor-Joining. Cây phân loại chủng AS2, AS3 và các chủng liên quan gần gũi được thể hiện

trên Hình 3 và Hình 4. Đây là các chi đã được chứng minh là có mặt trong metagenome mẫu đất ô nhiễm dioxin [5], [6] và được chứng minh về khả năng phân hủy các hợp chất là thành phần của chất diệt cỏ/dioxin [6], [4]. Điều đó cho thấy một số chi có mặt ưu thế trong mẫu đất ô nhiễm dioxin dù ở các vị trí và vùng sinh thái khác nhau (Biên Hòa, A So). Do đó, các kết quả nghiên cứu này là hoàn toàn phù hợp.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng AS3 và các loài liên quan gần gũi; Giá trị bootstrap (%) dựa trên 1.000 lần lặp

4. Kết luận

Hai chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu đất ô nhiễm dioxin tại sân bay A So có khả năng phân hủy các thành phần của chất diệt cỏ/dioxin với hiệu suất khá cao. Kết quả này là một minh chứng để chứng tỏ vai trò của vi sinh vật trong quá trình xử lý dioxin tại sân bay A So. Chủng AS2 có khả năng phân hủy 68,61% 2,4-D và 72,14% 2,4,5-T và làm giảm tổng độ độc của mẫu nghiên cứu xuống 71,83%. Chủng AS3 đã phân hủy 52,32% 2,4-D và 59,73% 2,4,5-T và làm giảm tổng độ độc của mẫu nghiên cứu xuống 41,73%. Các chủng này đã được định danh bằng nhuộm Gram và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA. Chủng AS2 thuộc nhóm Gram âm, thuộc chi *Klebsiella* và được đặt tên là *Klebsiella* sp. AS2. Chủng AS3 thuộc nhóm Gram dương, thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên là *Bacillus* sp. AS2. Cả 2 chủng được đăng ký trình tự 16S rRNA trên ngân hàng gen với mã số lần lượt là ON890383 và ON890397.

Lời cảm ơn

Bài báo được hoàn thiện với sự giúp đỡ, hỗ trợ phân tích của Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga, Khoa Hóa học/ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/REFERENCES

- [1] A. Schecter, L. Birnbaum, J. Ryan, and J. Constable, "Dioxins: Overview," *Environment Researcher*, vol. 101, pp. 419-428, 2006.
- [2] M. Hung, "Treatment of dioxin-contaminated soil at A So airport in A Luoi District, Thua Thien Hue province.," Center for Environmental Treatment Technology, Chemical Command, 2020. [Online]. Available: <http://trungtammoitruong.vn/> [Accessed January 7, 2023].
- [3] T. C. H. Dang, B. H. Nguyen, A. T. Mai, D. N. Nguyen, Q. V. Nguyen, and N. Q. Nguyen "Survey of microorganisms in areas contaminated with dioxin-containing herbicides in Da Nang airport area and detoxify of contaminated soil in laboratory conditions," *Journal of Biotechnology*, vol. 6, no. 4A, pp. 138-143, 2008.
- [4] B. H. Nguyen and T. C. H. Dang "Study on changes in the structure of microbial consortium during the treatment of soil contaminated with dioxin-containing herbicides at field scale by biodegradation technology," *Journal of Biology*, vol. 30, no. 1, pp. 55-61, 2008.
- [5] T. T. T. Nguyen, T. T. H. Dinh, and T. C. H. Dang "The ability to convert 2,4-DCP, 2,4,5-T of Dehalococcoides and the obligate anaerobic bacteria group from the herbicide/dioxin contaminated soil treatment plots at Da Nang airport," *Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 2, pp. 385-392, 2013.
- [6] Q. H. Pham, "Study on microbial diversity in herbicide/dioxin contaminated soil samples in Vietnam using Metagenomic tool," PhD thesis, Vietnam Academy of Science and Technology, 2020.
- [7] N. L. Pham, V. B. Nguyen, T. C. H. Dang, and N. M. Nghiem, "Isolation and identification of bacterial strain HR5.1 from herbicide/dioxin contaminated soil treated with aerobic bioreactor," *Journal of Science and Technology*, vol. 57, no. 9, pp. 41-45, 2009.
- [8] T. T. P. La, N. M. Nghiem, and T. C. H. Dang, "Some biological characteristics and ability to use 2,4,5-T of BDN15 bacterial strain isolated from contaminated soil," *Journal of Biotechnology*, vol. 3, no. 3, pp. 389-396, 2005.
- [9] K. H. C. Phung, "Research on the ability to remove reactive dyes color and decompose herbicides/dioxins of laccase enzyme-producing microorganisms," PhD thesis, Vietnam Academy of Science and Technology, 2018.
- [10] W. Y. Chen, J. H. Wu, Y. Y. Lin, H. J. Huang, and J. E. Chang, "Bioremediation potential of soil contaminated with highly substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: Microcosm study and microbial community analysis," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 261, pp. 351-361, 2013.