

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN BÁ HỮU

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG VI SINH VẬT VÀ MỘT SỐ GEN
LIÊN QUAN ĐẾN KHẢ NĂNG PHÂN HỦY 2,4,5-T VÀ DIOXIN
TRONG ĐẤT NHIỄM CHẤT ĐỘC HÓA HỌC**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số : 62 42 40 01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2010

Công trình được hoàn thành tại: Viện Công nghệ sinh học
Viện Khoa học & Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Đặng Thị Cẩm Hà, Viện Công nghệ sinh học
2. PGS. TS. Nông Văn Hải, Viện Công nghệ sinh học

Phản biện 1: GS. TS. Đặng Đình Kim,
Viện Công nghệ môi trường, Viện KH & CN Việt Nam

Phản biện 2: GS. TS. Nguyễn Thành Đạt,
Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Phản biện 3: GS. TS. Phạm Văn Ty,
Trường Đại học khoa học Tự nhiên-Đại học Quốc gia Hà Nội

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước, tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học & Công nghệ Việt Nam, 18-Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
vào hồi 8 giờ 30 ngày 22 tháng 6 năm 2010

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Viện Công nghệ sinh học

CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyễn Bá Hữu**, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà. 2006. Xác định nhóm vi khuẩn khử clo *Dehalococcoides* trong xử lý tẩy độc đất nhiễm chất dioxin. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(4): 519-526.
2. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà. 2007. Xác định gen mã hóa dioxygenaza của chủng xạ khuẩn phân hủy dibenzofuran *Rhodococcus* sp. HDN3 phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 45 (2): 61-67.
3. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà. 2007. Xác định gen mã hóa dioxygenaza 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.
4. **Nguyễn Bá Hữu**, Đàm Thúy Hằng, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà. 2007. Xác định cấu trúc tập đoàn vi khuẩn khử loại clo *Dehalococcoides* trong mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Đà Nẵng bằng kỹ thuật PCR-DGGE. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 16: 41-45.
5. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà. 2007. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học phân tử của ba chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng *Tạp chí Sinh học* 29(4): 80-85.
6. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà, Dietmar H. Pieper. 2007. Xác định cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng dựa trên phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn gen 16S rRNA. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 5(1): 123-132.
7. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà, Nông Văn Hải, Dietmar H. Pieper. 2007. Tính đa dạng của cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong quá trình xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở qui mô nhỏ hiện trường. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 5(2): 255-264.
8. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà. 2007. Xác định đoạn gen mã hóa dioxygenase của chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. Ao3 phân hủy dibenzofuran phân lập từ bùn ao thuộc khu đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 5(3): 391-396.
9. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà, Nông Văn Hải, Dietmar H. Pieper. 2007. Xác định đa dạng vi nấm trong đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng dựa trên phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn gen 18S rRNA. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 5(4): 513-521.
10. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà. 2008. Nghiên cứu sự biến động cấu trúc của tập đoàn vi sinh vật trong quá trình xử lý đất bị nhiễm chất diệt cỏ chứa đi-ô-xin ở qui mô hiện trường bằng công nghệ phân hủy sinh học. *Tạp chí Sinh học* 30 (1): 55-61.
11. **Nguyễn Bá Hữu**, Đặng Thị Cẩm Hà. 2008. Nghiên cứu sự phân bố của gen tham gia phân hủy 2,4-D trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin bằng hai kỹ thuật SSCP fingerprint và MPN-PCR. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6(1): 127-132.
12. **Nguyễn Bá Hữu**, Đàm Thúy Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà. 2008. Xác định các đoạn gen mã hóa enzyme chuyển hóa chất diệt cỏ từ ba chủng vi khuẩn phân hủy dibenzofuran. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6(2): 257-264.
13. **Nguyễn Bá Hữu**, Đàm Thúy Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà. 2008. Khả năng phân hủy diaryl ether và một số hợp chất vòng thơm khác của ba chủng vi khuẩn phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6(4A): 829-835.
14. **Nguyễn Bá Hữu**, Đàm Thúy Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà. 2008. 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. *Tạp chí Khoa học và công nghệ* 46(6): 59-65.
15. **Nguyen Ba Huu**, Dang Thi Cam Ha. 2008. Change of microbial community structure during active landfill bioremediation of herbicide/dioxin contaminated soil in Da Nang. *Advances in Natural Sciences* 9 (3): 337-344.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Từ 1961-1971, quân đội Mỹ đã rải hơn một trăm triệu lít chất độc hóa học xuống nhiều vùng ở miền Trung và Nam Việt Nam (Stellman và đtg, 2003). Hiện nay, đất và trầm tích tại khu vực bãi nhiễm sân bay Đà Nẵng vẫn bị ô nhiễm nặng 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid); 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) và dioxin. Khử độc đất nhiễm dựa trên công nghệ phân hủy sinh học rất được quan tâm do giá rẻ và thân thiện với môi trường. Công nghệ này đã được nghiên cứu ở phòng thí nghiệm và áp dụng ở qui mô pilot tại sân bay Đà Nẵng. Các nghiên cứu trước đã phân lập được một số chủng vi sinh vật sử dụng các chất diệt cỏ chứa dioxin và các hợp chất tương tự, tuy nhiên chưa có nghiên cứu chi tiết về thành phần loài vi sinh vật và gen chức năng tham gia chuyển hóa chất độc hóa học trong đất cũng như bùn hồ khu vực sân bay Đà Nẵng. Do hạn chế của các phương pháp dựa trên nuôi cấy nên các kỹ thuật sinh học phân tử được nhiều nghiên cứu sử dụng nhằm thu được kết quả gần với đa dạng thực của vi sinh vật ở tự nhiên. Các nhà nghiên cứu nhận thấy, kết hợp các phương pháp vi sinh vật truyền thống dựa trên nuôi cấy, phương pháp sinh hóa và sinh học phân tử trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật sẽ thu được kết quả chính xác hơn.

Công nghệ phân hủy sinh học được áp dụng khử độc đất nhiễm ở Đà Nẵng và Biên Hòa dựa trên kích thích các quần xã vi sinh vật bản địa tham gia vào quá trình phân hủy các chất độc. Do vậy, các dữ liệu về quần xã vi sinh vật ở khu vực bãi nhiễm cũng như sự biến động của các quần xã vi sinh vật trong quá trình xử lý là hết sức cần thiết cho các nhà nghiên cứu và công nghệ nhằm nâng cao hiệu quả khử độc các hợp chất đa vòng thơm chứa clo trong đó có dioxin.

Trên cơ sở khoa học và ý nghĩa thực tiễn được trình bày ở trên, Luận án đã được thực hiện với mục đích và nội dung sau:

2. Mục đích nghiên cứu

Nghiên cứu đa dạng vi sinh vật trong đất nhiễm và biến động cấu trúc quần xã vi sinh vật trong các công thức xử lý chất độc hóa học bằng “phân hủy sinh học”. Tìm hiểu khả năng phân hủy và một số gen liên quan đến

3. Nội dung nghiên cứu

- a. Nghiên cứu đa dạng vi sinh vật trong đất, hồ bị ô nhiễm và trong các công thức xử lý khử độc;
- b. Nghiên cứu đa dạng gen *tfdA* trong các mẫu đất nhiễm;
- c. Nghiên cứu đa dạng vi khuẩn kỵ khí tùy tiện và vi khuẩn khử loại clo *Dehalococcoides* trong bùn hồ khu vực bãi nhiễm;
- d. Nghiên cứu biến động quần xã vi khuẩn trong các công thức xử lý đất nhiễm chất độc hóa học;
- e. Phân lập, nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và định tên một số chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D, dioxin và các chất tương tự;
- f. Xác định sự có mặt của gen mã hóa dioxygenase và gen *tftA* (*cadA*) liên quan đến phân hủy 2,4,5-T trong một số chủng vi khuẩn.

4. Những đóng góp mới của luận án

- a. Đây là công trình nghiên cứu sâu đầu tiên ở Việt Nam về đa dạng vi sinh vật trong đất và bùn hồ nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại khu bãi nhiễm sân bay Đà Nẵng.
- b. Đã ứng dụng thành công 4 kỹ thuật sinh học phân tử: phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn (SSCP) và điện di trên gel với dải nồng độ chất biến tính (DGGE) các đoạn gen *tfdA*, 16S rRNA và 18S rRNA để đánh giá quần xã vi khuẩn và nấm trong đất và bùn hồ nhiễm cũng như trong các công thức tẩy độc đất nhiễm bằng phân hủy sinh học, xác định số lượng đoạn gen *tfdA* trong đất nhiễm và áp dụng BOX-PCR và MPN-PCR để phân biệt sự khác nhau giữa các vi sinh vật.
- c. Phát hiện được ba chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. Ao3, *Terrabacter* sp. DMA và *Rhodococcus* sp. HDN3 sử dụng dibenzofuran và các hợp chất tương tự, trong đó chủng HDN3 sử dụng được dibenzo-*p*-dioxin và 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin như là nguồn carbon và năng lượng duy nhất. Nhóm vi khuẩn kỵ khí *Sedimentibacter* được phát hiện trong công thức xử lý khử độc bằng công nghệ “chôn lấp tích cực”.
- d. Xác định được đoạn gen giống *ahDO* chủng vi khuẩn Ao3 và hai đoạn gen *dbfA1* trong hai chủng DMA và HDN3 mã hóa các dioxygenase

tham gia bước đầu tiên của phân hủy các hợp chất vòng thơm. Đồng thời cũng đã phát hiện được gen *tfdA* và *tftA(cadA)* trong 3 chủng vi khuẩn kể trên và chủng vi khuẩn *Arthrobacter* sp. DNB19 sử dụng 2,4-D và PAH. Sự phát hiện các gen trên là cơ sở chứng minh quá trình chuyển các gen chức năng trong vi sinh vật ở khu vực bãi nhiễm Đà Nẵng.

5. Bố cục của luận án: Luận án gồm 149 trang

Mở đầu: 4 trang

Chương I. Tổng quan tài liệu: 45 trang

Chương II. Vật liệu và phương pháp: 12 trang

Chương III. Kết quả và thảo luận: 66 trang (11 bảng và 31 hình)

Kết luận và kiến nghị: 2 trang

Tài liệu tham khảo: 18 trang gồm: 21 tài liệu tiếng Việt, 182 tài liệu tiếng Anh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Phân hủy sinh học 2,4-D; 2,4,5-T, dioxin và các chất tương tự

1.1.1. Phân hủy sinh học 2,4-D và 2,4,5-T

Các công bố tập trung chủ yếu vào phân hủy hiếu khí 2,4-D và 2,4,5-T của vi khuẩn. Phân hủy 2,4-D thành 2,4-DCP (2,4-dichlorophenol) do enzym dioxygenase phụ thuộc α -ketoglutarate được mã hóa bởi gen *tfdA*. Gen *tfdA* có ở vi khuẩn β và γ -*proteobacteria*, chia thành 3 lớp và thường nằm trên plasmid. Một số TfdA cũng chuyển hóa 2,4,5-T ở mức thấp. Gen *tfdA* ở vi khuẩn α -*proteobacteria* được đặt tên là *tfdA α* .

2,4,5-T khó bị phân hủy sinh học hơn 2,4-D và có ít công bố về phân hủy hợp chất này. Chủng vi khuẩn sử dụng 2,4,5-T được nghiên cứu kỹ đó là *B. phenoliruptrix* AC1100. 2,4,5-T được chuyển hóa đến 2,4,5-TCP (2,4,5-trichlorophenol) với sự tham gia của 2,4,5-T monooxygenase và được mã hóa bởi gen *tftA* và *tftB*. Các tế bào nghỉ chủng *Bradyrhizobium* sp. HW13 chuyển hóa cả 2,4-D và 2,4,5-T. Chủng này chứa các gen *cadAB* có sự giống nhau đáng kể với gen *tftAB* của *B. phenoliruptrix* AC1100 (Kitagawa và đtg, 2002). Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu về vi sinh vật và gen chuyển hóa chất diệt cỏ. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về chủng loài, gen chức năng ở vi khuẩn và đất nhiễm chất độc hóa học tại sân bay Đà Nẵng.

1.1.2. Phân hủy sinh học dioxin và các hợp chất tương tự

Phân hủy sinh học dioxin và các hợp chất tương tự ở điều kiện hiếu khí được nghiên cứu kỹ nhất ở chủng vi khuẩn *Sphingomonas* sp. RW1 và bước chuyển hóa đầu tiên có sự tham gia của enzym dioxygenase. Oxy hóa kép xảy ra ở các vị trí bên 1,2; 2,3 và 3,4 hoặc ở vị trí góc 4,4a. Oxy hóa kép vị trí góc được quan tâm hơn cả vì phá vỡ được cấu trúc mặt phẳng là nguyên nhân gây độc của dioxin. Phân hủy dioxin ở điều kiện kỵ khí dẫn đến loại bớt hoặc khử hoàn toàn clo của các dioxin. Các nghiên cứu phân hủy dioxin và các hợp chất tương tự ở vi nấm chủ yếu tập trung ở các nấm đảm. Hiện mới chỉ có thử nghiệm tại sân bay Đà Nẵng về cô lập kết hợp kích thích sinh học và “chôn lấp tích cực” để khử độc đất nhiễm dioxin. “Chôn lấp tích cực” dựa trên sự kết hợp của cô lập, hấp phụ và kích thích vi sinh vật bản địa đang được áp dụng xử lý 3.384 m³ đất nhiễm chất độc hóa học tại sân bay Biên Hòa. Các nghiên cứu trước đây ở Việt Nam mới chỉ khảo sát số lượng và định loại được một số chủng vi sinh vật tại các “điểm nóng”.

1.2. Đa dạng vi sinh vật và các phương pháp nghiên cứu

Các nghiên cứu đa dạng vi sinh vật đất đang khai thác tính đa dạng chủng loài và các gen chức năng của các vi sinh vật cũng như trực tiếp từ đất. Mỗi kỹ thuật có các ưu, nhược điểm riêng. Sự kết hợp của một số kỹ thuật sẽ đem lại cách đánh giá tổng quát hơn về đa dạng vi sinh vật. Đa dạng vi sinh vật sẽ được đánh giá ở mức thấp khi chỉ sử dụng các phương pháp phụ thuộc nuôi cấy. Chỉ xấp xỉ 1% vi khuẩn (Davis và đtg, 2005) và số nhỏ vi nấm có thể nuôi cấy được ở phòng thí nghiệm (Hawksworth, 2001). Các phương pháp sinh học phân tử đang được sử dụng để có hiểu biết đầy đủ hơn về đa dạng vi khuẩn và vi nấm. Các kỹ thuật DGGE, SSCP, MPN-PCR, BOX-PCR và xác định trình tự gen đã được tiến hành nhằm tìm hiểu đa dạng vi sinh vật và gen chức năng trong các mẫu đất, bùn nhiễm chất độc hóa học cũng như trong các công thức khử độc tại Đà Nẵng. Bên cạnh đó, phân lập, định loại một số chủng vi khuẩn và xác định sự có mặt của một số gen chức năng tham gia vào quá trình phân hủy các chất độc sẽ cung cấp thêm dữ liệu về tính đa dạng vi sinh vật trong đất và bùn nhiễm chất độc hóa học ở sân bay Đà Nẵng.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu và công thức xử lý

- 9 mẫu đất tại bãi nhiễm (HDN1-HDN9), 10 mẫu bùn hồ A bị ảnh hưởng trực tiếp nước từ bãi nhiễm (A1-A10), 2 mẫu bùn hồ B (B1-B2) và 1 mẫu bùn hồ C (C1) ít bị ảnh hưởng trực tiếp nước từ bãi nhiễm chất độc hóa học sân bay Đà Nẵng.
- 4 công thức xử lý cô lập và kích thích sinh học 0,5m³ (0,5DN1 đến 0,5DN4) và 1 công thức đối chứng cô lập 0,5m³ (0,5DN5). Đất được lấy ở 1 điểm trộn đều và cho vào các thùng 0,5DN.
- Đất tại 5 vị trí ở bãi nhiễm có nồng độ chất độc hóa học khác nhau được cho vào 5 công thức xử lý cô lập và kích thích sinh học 1,5m³ (1,5DN1; 1,5DN2; 1,5DN3; 1,5DN4 và 1,5DN5).
- 10 m³ và 100 m³ đất tại 2 vị trí khác nhau ở bãi nhiễm được xử lý “chôn lấp tích cực” và được ký hiệu là 10DNT và 100DNT.
- Mẫu trong các công thức xử lý được thu thập ở 4 thời điểm. Ba đợt đầu mỗi đợt cách nhau khoảng 6 tháng, đợt thứ tư cách đợt thứ ba khoảng 30 tháng.
- Các sinh phẩm và hóa chất dùng trong nghiên cứu cung cấp bởi hãng, Mo Bio, Invitrogen, Abgene, Promega, Fermentas, Fluka, Biorad, Applied Biosystems v.v.
- Thí nghiệm được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học, Phòng nghiên cứu phân hủy sinh học - Trung tâm nghiên cứu bệnh truyền nhiễm Helmholtz, Cộng hòa liên bang Đức và phòng kỹ nghệ sinh học-Đại học Công giáo Louvain, Vương quốc Bỉ.

2.2. Phương pháp

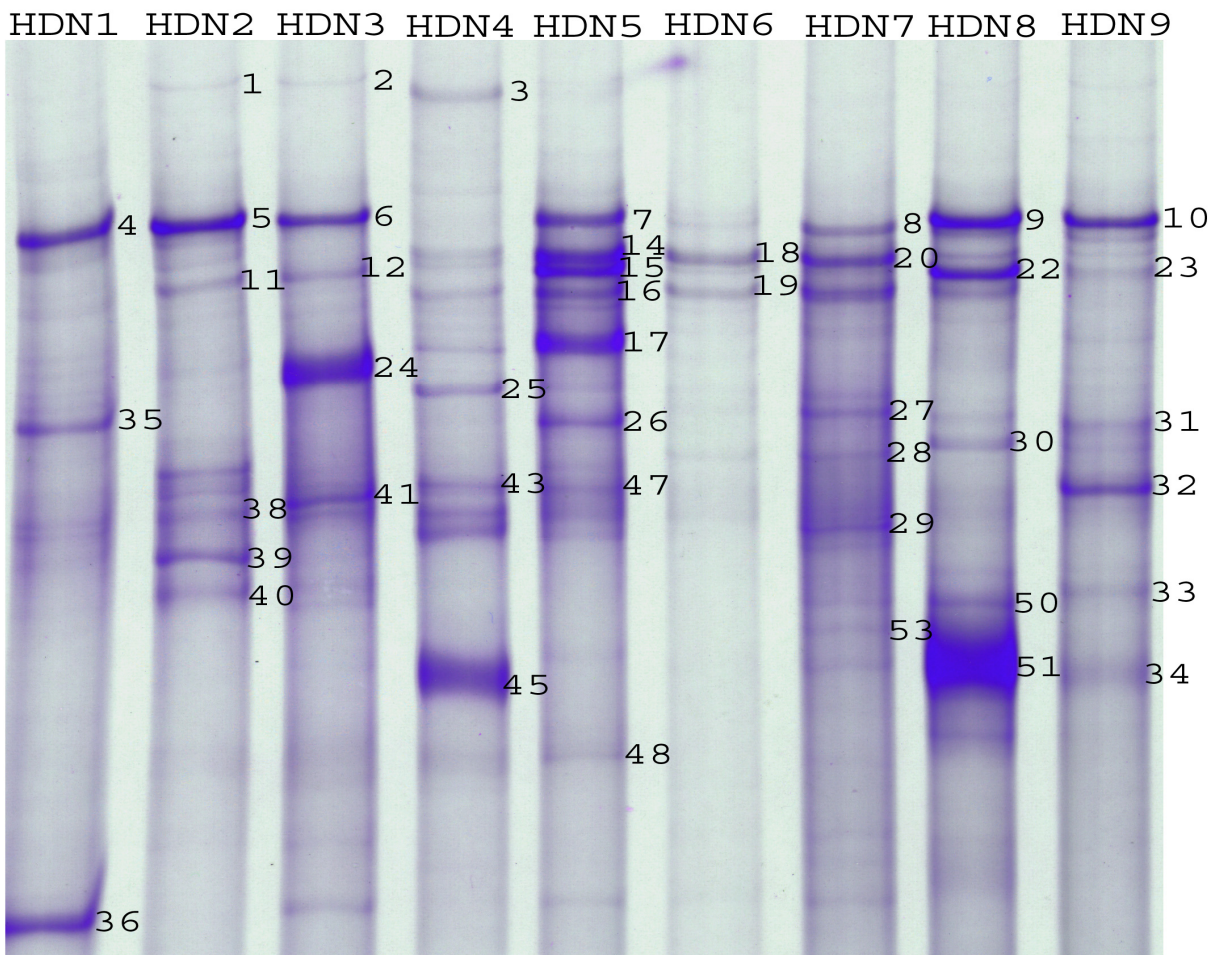
- Phương pháp phân lập, nuôi cấy và định loại vi khuẩn sử dụng dibenzofuran và các chất tương tự.
- Phương pháp phân tích đa dạng vi sinh vật trong đất, bùn hồ nhiễm và trong các công thức khử độc chất độc hóa học bằng phân hủy sinh học: MPN-PCR, BOX-PCR, PCR-SSCP và PCR-DGGE.
- Phương pháp xác định các đoạn gen *tfdA*, *tftA(cadA)* và gen mã hóa enzym dioxygenase trong các mẫu đất và các chủng vi khuẩn.
- Các chương trình tin sinh học phân tích gen: Clustal X, Bioedit, Gendoc, NJ, Blast, RDP v.v.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đa dạng vi sinh vật trong các mẫu đất

3.1.1. Đa dạng vi khuẩn xác định bằng kỹ thuật SSCP

Mẫu HDN4 và HDN6 khô hơn, có độ ô nhiễm cao hơn và có mức đa dạng vi khuẩn thấp hơn so với các mẫu khác (hình 3.1). Trình tự 46 dòng DNA thuộc các lớp vi khuẩn *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, α , β và γ *proteobacteria*. Vi khuẩn chi *Burkholderia* chiếm ưu thế trong 9 mẫu đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở Đà Nẵng. Vi khuẩn sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T phân lập từ đất nhiễm chất độc da cam tại Florida (Mỹ) có quan hệ gần gũi với các vi khuẩn chi *Burkholderia* (Rice và đtg, 2005).



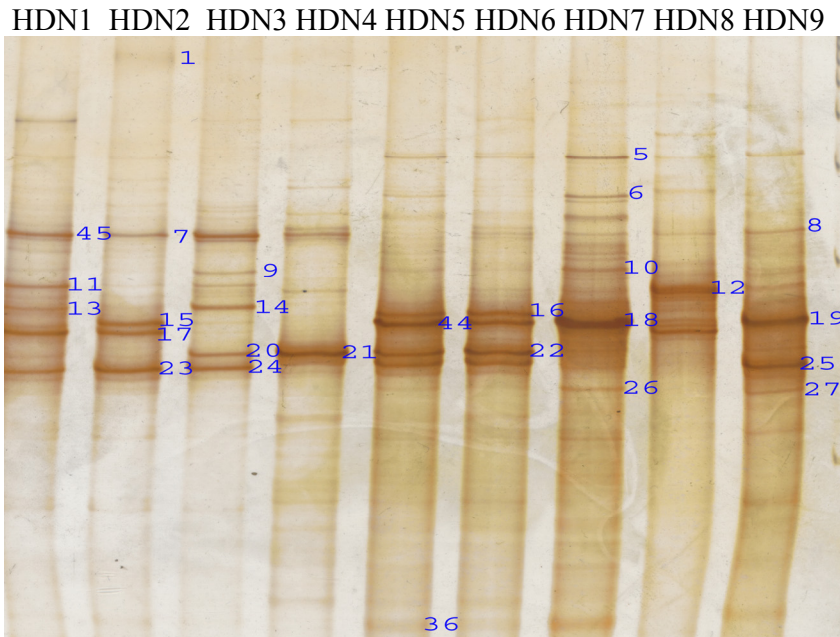
Hình 3.1. Điện di đồ SSCP 9 mẫu đất nhiễm, số ghi bên phải các băng DNA là tên của các dòng được xác định trình tự nucleotide.

Trong nghiên cứu này cũng phát hiện được hai chi *Rhodococcus* và *Micobacterium*, một số vi khuẩn đất *Frateuria*, *Nevsia*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* và vi khuẩn ưa axit *Acidocella*, *Acidiphillum* và *Acidobacterium* (bảng 3.1).

Bảng 3.1. Mối quan hệ giữa một số dòng tách từ gel SSCP và các vi khuẩn đã công bố

Dòng	Số Genbank	Lớp	Vi khuẩn gần gũi nhất	
27HDN7	DQ991279	Acidobacteria	VK đất <i>Acidobacteriaceae</i> 1496-2 không nuôi cấy	
30HDN8	DQ991282		<i>Acidobacterium capsulatum</i> 161 không nuôi cấy	
31HDN9	DQ991283		<i>Acidobacteriaceae</i> WD257	
32HDN9	DQ991284		VK đất rừng <i>Acidobacterium</i> không nuôi cấy	
33HDN9	DQ991285		Vi khuẩn Ellin310	
35HDN1	DQ991287		VK đất <i>Acidobacterium</i> 466-2 không nuôi cấy	
41HDN3	DQ991292		Vi khuẩn RCP2-90 không nuôi cấy	
24HDN3	DQ991276	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i> sp. 'Bavariae'	
29HDN7	DQ991281		<i>Micromonospora</i> sp. IM-1078	
43HDN4	DQ991294		<i>Rhodococcus fascians</i> D188	
45HDN4	DQ991295		<i>R. opacus</i> M213	
26HDN5	DQ991278	Alpha proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp. TS7	
28HDN7	DQ991280		Alpha proteobacterium A0839	
34HDN9	DQ991286		<i>Acidocella</i> sp. GS19h	
38HDN2	DQ991289		<i>Tistrella mobilis</i>	
47HDN5	DQ991296		<i>Bradyrhizobium elkanii</i> BR3262	
50HDN8	DQ991298		<i>Acidocella facilis</i> ATCC 35904 ^T	
51HDN8	DQ991299		<i>Acidocella</i> sp. St1-2	
53HDN7	DQ991300	<i>Acidiphilium aminolytica</i> 101 ^T		
1HDN2	DQ991255	Beta proteobacteria	VK chưa định loại <i>Burkholderiaceae</i> 005-D	
2HDN3	DQ991256		VK chưa định loại <i>Burkholderiaceae</i> 005-D	
3HDN4	DQ991257		<i>Delftia acidovorans</i> B	
4HDN1	DQ991258		VK chưa định loại <i>Burkholderiaceae</i> 005-D	
5HDN2	DQ991259		VK chưa định loại <i>Burkholderiaceae</i> 005-D	
6HDN3	DQ991260		VK chưa định loại <i>Burkholderiaceae</i> 005-D	
7HDN5	DQ991261		VK chưa định loại <i>Burkholderiaceae</i> 005-D	
8HDN7	DQ991262		VK phân hủy 2,4-D <i>Burkholderiaceae</i> TFD6	
9HDN8	DQ991263		VK chưa định loại <i>Burkholderiaceae</i> 005-D	
10HDN9	DQ991264		VK chưa định loại <i>Burkholderiaceae</i> 005-D	
11HDN2	DQ991265		<i>Burkholderia cepacia</i> LMG 12615	
12HDN3	DQ991266		<i>B. glathei</i> Hg 5	
14HDN5	DQ991267		<i>Burkholderia</i> sp. S2.1	
15HDN5	DQ991268		<i>B. caryophylli</i> ATCC 25418 ^T	
16HDN5	DQ991269		<i>B. caryophylli</i> ATCC 25418 ^T	
19HDN6	DQ991271		<i>B. caryophylli</i> ATCC 25418 ^T	
18HDN6	DQ991272		<i>Burkholderia</i> sp. A6.2	
20HDN7	DQ991273		<i>Burkholderia</i> sp. A6.2	
22HDN8	DQ991274		<i>B. caryophylli</i> ATCC 25418 ^T	
23HDN9	DQ991275		<i>B. graminis</i> C4D1M ^T	
25HDN4	DQ991277		<i>B. kururiensis</i> KP23T	
17HDN5	DQ991270		Gamma proteobacteria	<i>Gammaproteobacterium</i> Ellin5264
36HDN1	DQ991288			VK vùng rễ nhỏ wr0008 không nuôi cấy
39HDN2	DQ991290			VK đất 7-03 đề kháng với Arsenic 7-03
40HDN2	DQ991291			Gamma proteobacterium MN 154.3
42HDN3	DQ991293	VK vùng rễ nhỏ wr0008 không nuôi cấy		
48HDN5	DQ991297	<i>Fulvimonas soli</i> LMG 19981 ^T		

3.1.2. Đa dạng vi nấm xác định bằng kỹ thuật PCR-SSCP.



Hình 3.2. Điện di
đồ SSCP phân tích
đa dạng quần xã vi
nấm trong 9 mẫu
đất nhiễm chất diệt
cỏ chứa dioxin.

Bảng 3.2. Quan hệ giữa các dòng từ gel SSCP và các vi nấm đại diện

Dòng	Mã số GenBank	Nấm gần gũi nhất
1HDN2	DQ986919	<i>Capnobotryella renispora</i> UAMH 9870
5HDN7	DQ986920	<i>Anguillospora furtiva</i> CCM F-20483
6HDN7	DQ986921	<i>Anguillospora furtiva</i> CCM F-20483
7HDN2	DQ986922	<i>Cladosporium staurophorum</i> STE-U 3687
8HDN9	DQ986923	<i>C. taurophorum</i> STE-U 3687, <i>Cudoniella clavus</i> BM18#13,
9HDN3	DQ986924	Dòng eukaryote RT3n2 không nuôi cấy
10HDN7	DQ986925	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53
11HDN1	DQ986926	<i>Setosphaeria monoceras</i> CBS 154.26
12HDN8	DQ986927	<i>Aspergillus fumigatus</i> ALI 57
13HDN1	DQ986928	<i>Talaromyces leycettanus</i> CBS 398.68
14HDN3	DQ986929	<i>Penicillium commune</i> IBT 15141
15HDN2	DQ986930	<i>Hymenoscyphus ericae</i> UAMH 8873
16HDN6	DQ986931	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53
17HDN2	DQ986932	<i>Exophiala</i> sp. NH3-6
18HDN7	DQ986933	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53
19HDN9	DQ986934	<i>Tetrachaetum elegans</i> 30-426
20HDN3	DQ986935	<i>Nectria lugdunensis</i> CBE98
21HDN4	DQ986936	<i>Cordyceps sinensis</i> RE2-4-3, <i>N. lugdunensis</i> CBE98
22HDN6	DQ986937	<i>Fusarium oxysporum</i> 26-1, <i>N. lugdunensis</i> CBE98
23HDN2	DQ986938	<i>Coniochaeta ligniaria</i> C8
24HDN3	DQ986939	<i>Ophiostomatales</i> sp. C6, <i>Coniochaeta ligniaria</i> C8
25HDN9	DQ986940	<i>Ophiostomatales</i> sp. C6
26HDN7	DQ986941	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53
27HDN9	DQ986942	<i>Togninia minima</i> CBS213.31
36HDN5	DQ986943	<i>Lewia infectoria</i> IMI 303186
44HDN5	DQ986944	<i>Phacidium coniferarum</i> CBS320.53
45HDN1	DQ986945	Dòng RT3n2 không nuôi cấy, <i>C. staurophorum</i> STE-U 3687

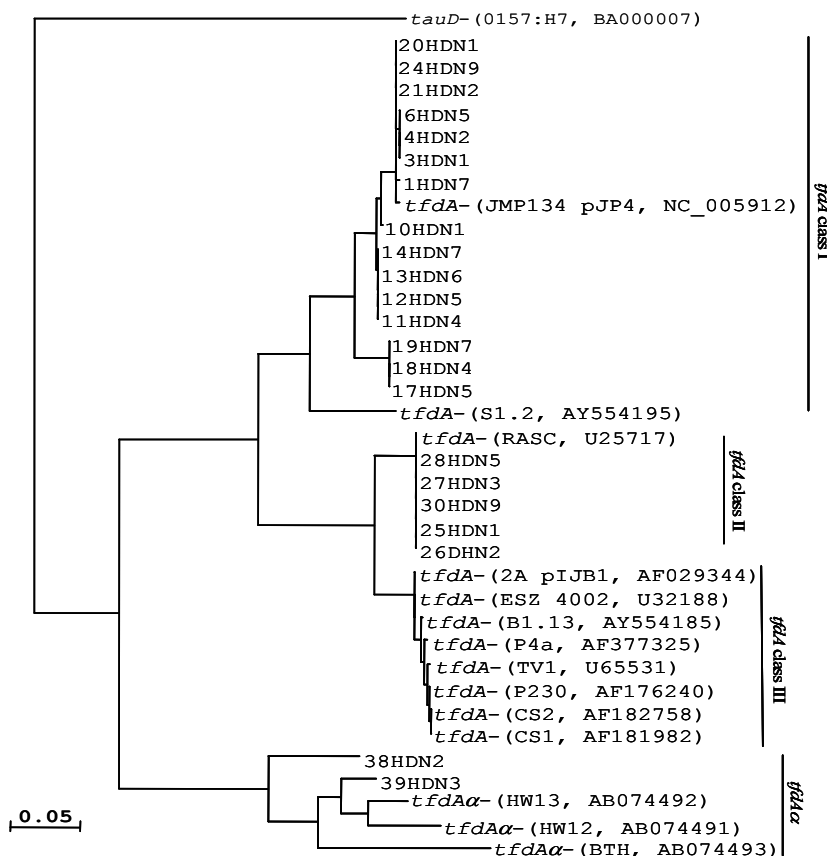
Các mẫu HDN4, HDN5, HDN6 và HDN8 nằm ở gần khu vực giữa bãi nhiễm có nồng độ chất độc hóa học cao và mẫu ở tình trạng khô nên có đa dạng vi nấm thấp hơn (hình 3.2). Các chi nấm trội trong 9 mẫu đất nhiễm gồm *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum* (bảng 3.2). Các chất diệt cỏ và thuốc trừ sâu cũng có ảnh hưởng đến quần xã vi nấm. Đa dạng các loài nấm giảm đi sau 10 năm quan sát đất nhiễm chất da cam tại kho chứa ở Mississippi (Mỹ) và các loài nấm phổ biến thuộc các chi *Penicillium*, *Mucor* và *Fusarium* (Young, 2006).

Các nghiên cứu trước đã phân lập được vi nấm sử dụng các chất độc từ đất nhiễm tại sân bay Đà Nẵng và chủ yếu thuộc chi *Aspergillus* (Hoàng Thị Mỹ Hạnh và đtg, 2004, Đặng Thị Cẩm Hà và đtg, 2005).

3.1.3. Đa dạng gen *tfdA* mã hóa enzym phân hủy 2,4-D

Bảng 3.3. Xác định số lượng bản sao đoạn gen *tfdA* trong đất nhiễm chất độc hóa học

HDN1	HDN2	HDN3	HDN4	HDN5	HDN6	HDN7	HDN8	HDN9
3,67 x 10 ⁵	1,31 x 10 ⁵	1,11 x 10 ⁵	1,06 x 10 ⁵	5,78 x 10 ⁵	5,99 x 10 ⁶	2,85 x 10 ⁵	5,27 x 10 ⁵	5,99 x 10 ⁶



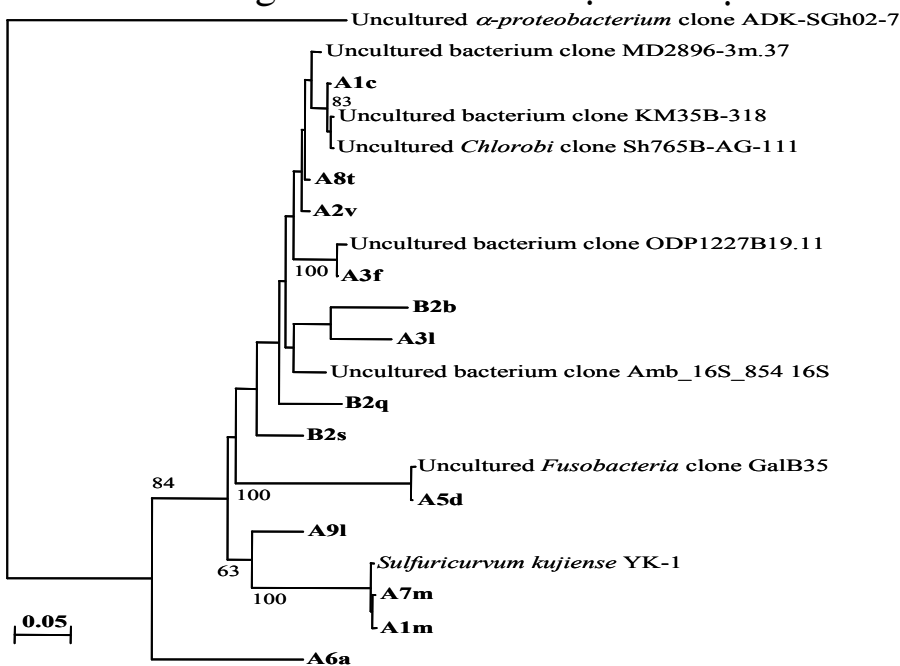
Hình 3.3. Phân tích đa dạng đoạn gen *tfdA* trong đất nhiễm chất độc hóa học bằng kỹ thuật PCR-SSCP. M-thang DNA chuẩn X (Roche).

Số lượng bản sao đoạn gen *tfdA* trong 1 g đất nhiễm từ $1,06 \times 10^5$ đến $5,99 \times 10^6$ và số lượng cao nhất $5,99 \times 10^6$ ở 2 mẫu HDN6 và HDN9 (bảng 3.3). de Liphay và đtg (2001) sử dụng kỹ thuật MPN-PCR tương tự và thấy rằng, số lượng bản sao gen *tfdA* đạt 10^2 /ml nước sau khi có bổ sung 2,4-D. Các đoạn gen *tfdA* lớp I và II chiếm ưu thế và gen *tfdA α* chiếm tỷ lệ nhỏ trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin (hình 3.3). Kết quả này cũng phù hợp với đa dạng vi khuẩn trong 9 mẫu đất nhiễm chất độc hóa học.

3.2. Đa dạng vi khuẩn trong các mẫu bùn hồ

3.2.1. Đa dạng vi khuẩn kỵ khí tùy tiện

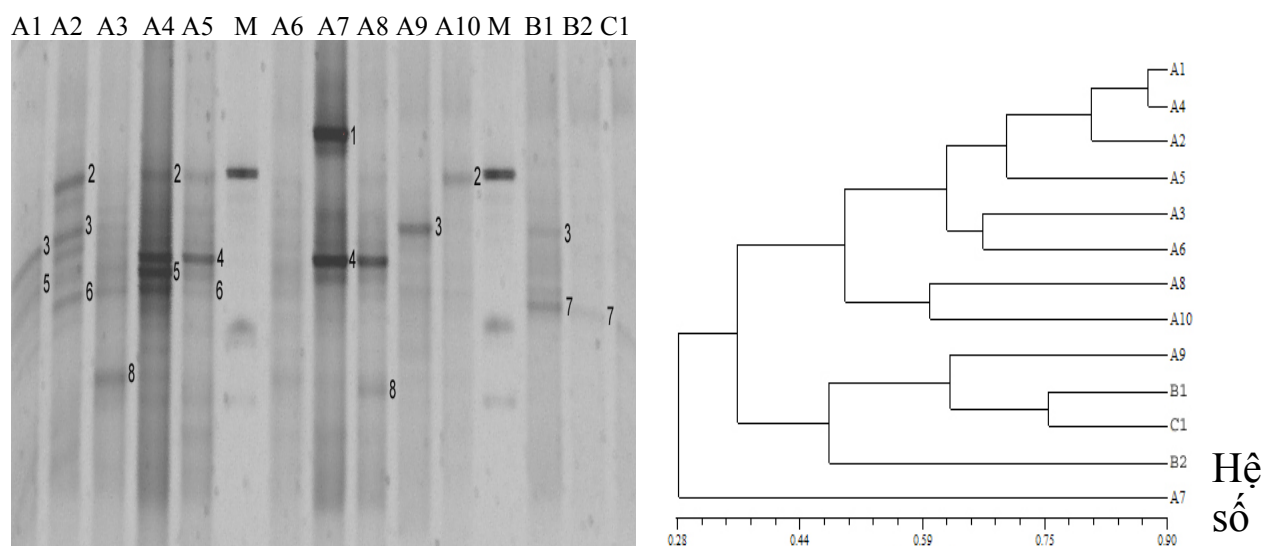
Các mẫu bùn hồ A có mức đa dạng vi khuẩn lớn hơn so với hai hồ B và C. Trình tự một số băng DNA trong các mẫu bùn hồ có quan hệ gần gũi với nhiều dòng vi khuẩn không nuôi cấy của các nhóm *Alphaproteobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Sulfuricurvum*, *Fusobacteria* và *Nitrospiraceae* (hình 3.4). Ngoài ra, một số dòng khác có tương đồng cao với các dòng vi khuẩn chưa được xác định.



Hình 3.4. Phân tích đa dạng vi khuẩn các mẫu bùn hồ khu vực nhiễm CDHH bằng kỹ thuật DGGE. M-thang DNA Smart 200 bp.

3.2.2. Đa dạng vi khuẩn khử loại clo *Dehalococcoides*

Các vi khuẩn *Dehalococcoides* được tìm thấy trong các mẫu trầm tích nhiễm dioxin. Tuy nhiên, rất ít vi khuẩn *Dehalococcoides* đã được phân lập. Các mẫu bùn hồ A có sự đa dạng vi khuẩn khử loại clo lớn hơn so với ở hai hồ B và C (hình 3.5). Kết quả này phù hợp với kết quả ở mục 3.2.1. Hệ số tương đồng di truyền nhóm vi khuẩn *Dehalococcoides* trong các mẫu bùn từ 28 đến 87,5%.



Hình 3.5. Điểm chỉ phân tử đoạn gen mã hóa 16S rRNA vi khuẩn *Dehalococcoides* trên gel DGGE và quan hệ di truyền nhóm vi khuẩn *Dehalococcoides* trong các mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất độc hóa học.

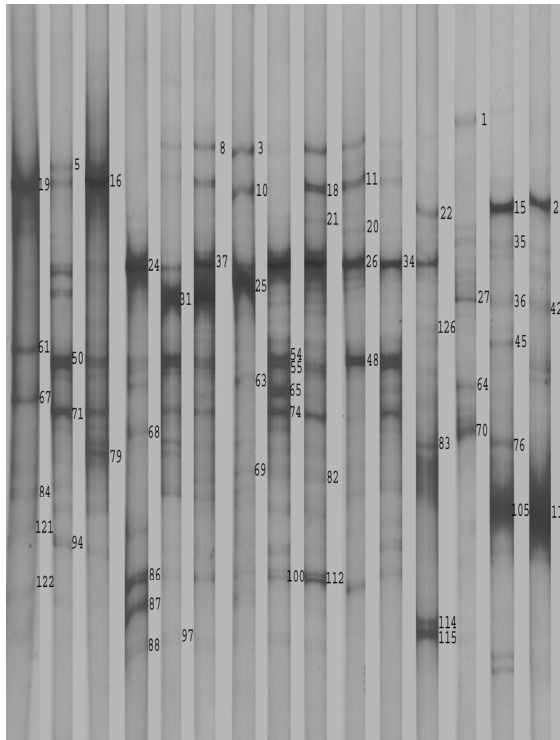
Các vi khuẩn *Dehalococcoides* được tìm thấy trong các mẫu trầm tích nhiễm dioxin. Tuy nhiên, rất ít vi khuẩn *Dehalococcoides* đã được phân lập. Các mẫu bùn hồ A có sự đa dạng vi khuẩn khử clo lớn hơn so với ở hai hồ B và C (hình 3.5). Kết quả này phù hợp với kết quả ở mục 3.2.1. Hệ số tương đồng di truyền nhóm vi khuẩn *Dehalococcoides* trong các mẫu bùn từ 28 đến 87,5%.

3.3. Biến động cấu trúc quần xã vi khuẩn trong các thử nghiệm khử độc đất nhiễm chất độc hóa học

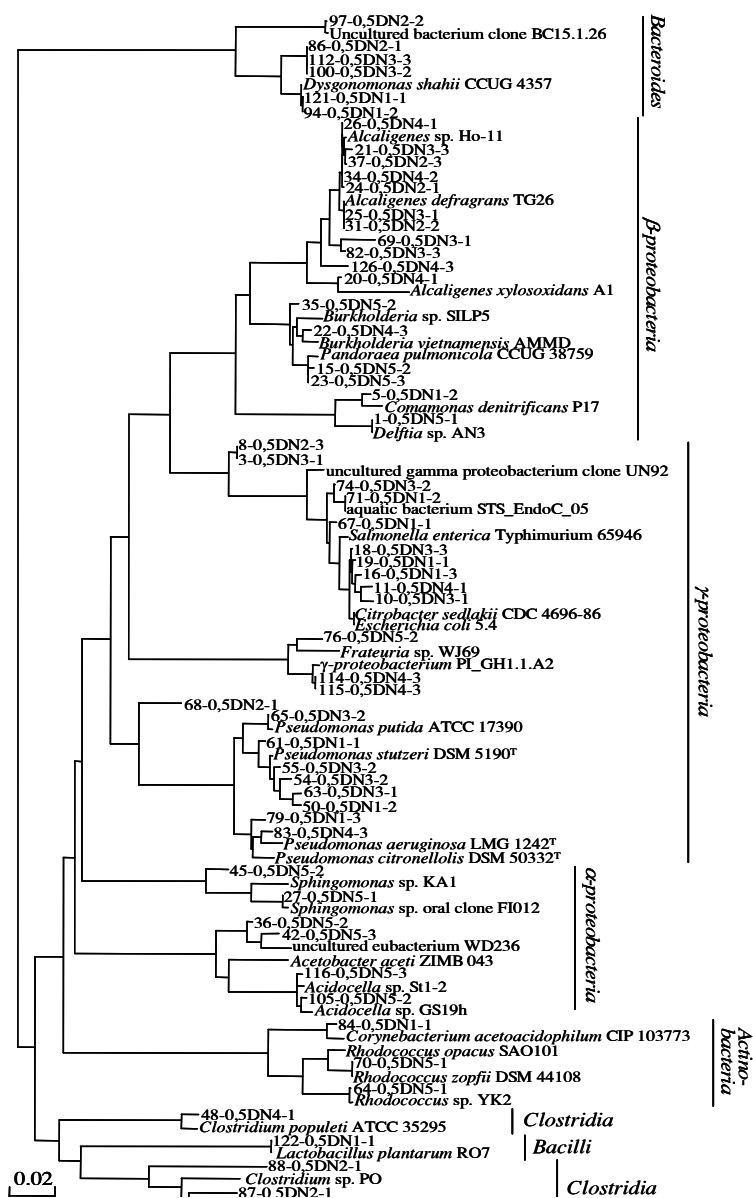
3.3.1. Xác định cấu trúc quần xã vi khuẩn trong các công thức 0,5DN bằng kỹ thuật SSCP

Công thức 0,5DN4 và 0,5DN5 có độ đa dạng thấp hơn các công thức khác (hình 3.6). Hai công thức 0,5DN2 và 0,5DN3 có tỷ lệ cân đối hơn giữa nguồn carbon khác nên có lẽ đã thúc đẩy sự sinh trưởng của nhiều nhóm vi sinh vật. Thông qua nuôi cấy, đã phân lập được 8 loại vi khuẩn (Đặng Thị Cẩm Hà và đtg, 2005). Trên gel SSCP, số lượng băng DNA nhiều hơn và vi khuẩn thuộc 7 lớp gồm *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Clostridia*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* và *Bacilli*. Như vậy, điều kiện xử lý có thuận lợi cho vi khuẩn kỵ khí và kỵ khí tùy tiện phát triển. Trong các công thức đều thấy các băng DNA đậm và có quan hệ gần với vi khuẩn các chi *Pseudomonas* (*P. stutzeri*), *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Kerstersia*, *Delftia* (hình 3.6).

1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 3-1 3-2 3-3 4-1 4-2 4-3 5-1 5-2 5-3



Hình 3.6. Phân tích đa dạng vi khuẩn trong các công thức 0,5DN bằng kỹ thuật SSCP và cây phát sinh loài của các dòng tách từ gel SSCP và các chủng vi khuẩn đại diện. 1-1, 1-2... đến 5-3, tương ứng với ba đợt lấy mẫu.

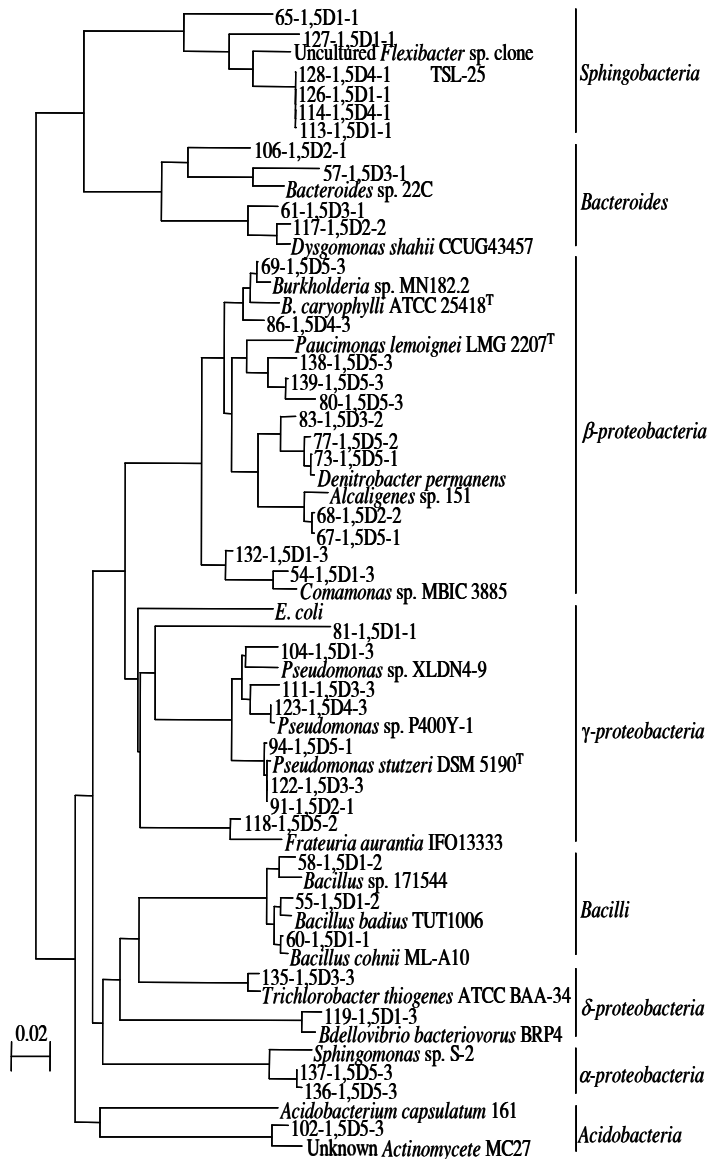


3.3.2. Cấu trúc quần xã vi khuẩn trong các công thức 1,5DN xác định bằng kỹ thuật SSCP

Các công thức 1,5DN4 và 1,5DN5 có độ đa dạng vi khuẩn thấp hơn. Công thức 1,5DN1 có độ đa dạng vi khuẩn lớn nhất, mẫu đất của công thức xử lý này được lấy tại mép của bãi nhiễm có nồng độ chất ô nhiễm thấp hơn mẫu ở giữa bãi. Mẫu 1,5DN5 đã được xác định có mức nhiễm độc cao nhất. Thông qua nuôi cấy đã phân lập được 8 loại vi khuẩn thật và 2 loại xạ khuẩn ở các công thức 1,5DN (Đặng Thị Cẩm Hà và đtg, 2008). Tuy nhiên, số lượng băng DNA nhiều hơn hẳn trên gel SSCP và thuộc 8 lớp vi khuẩn *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroides*, *Sphingobacteria* và *Bacilli* (hình 3.7).



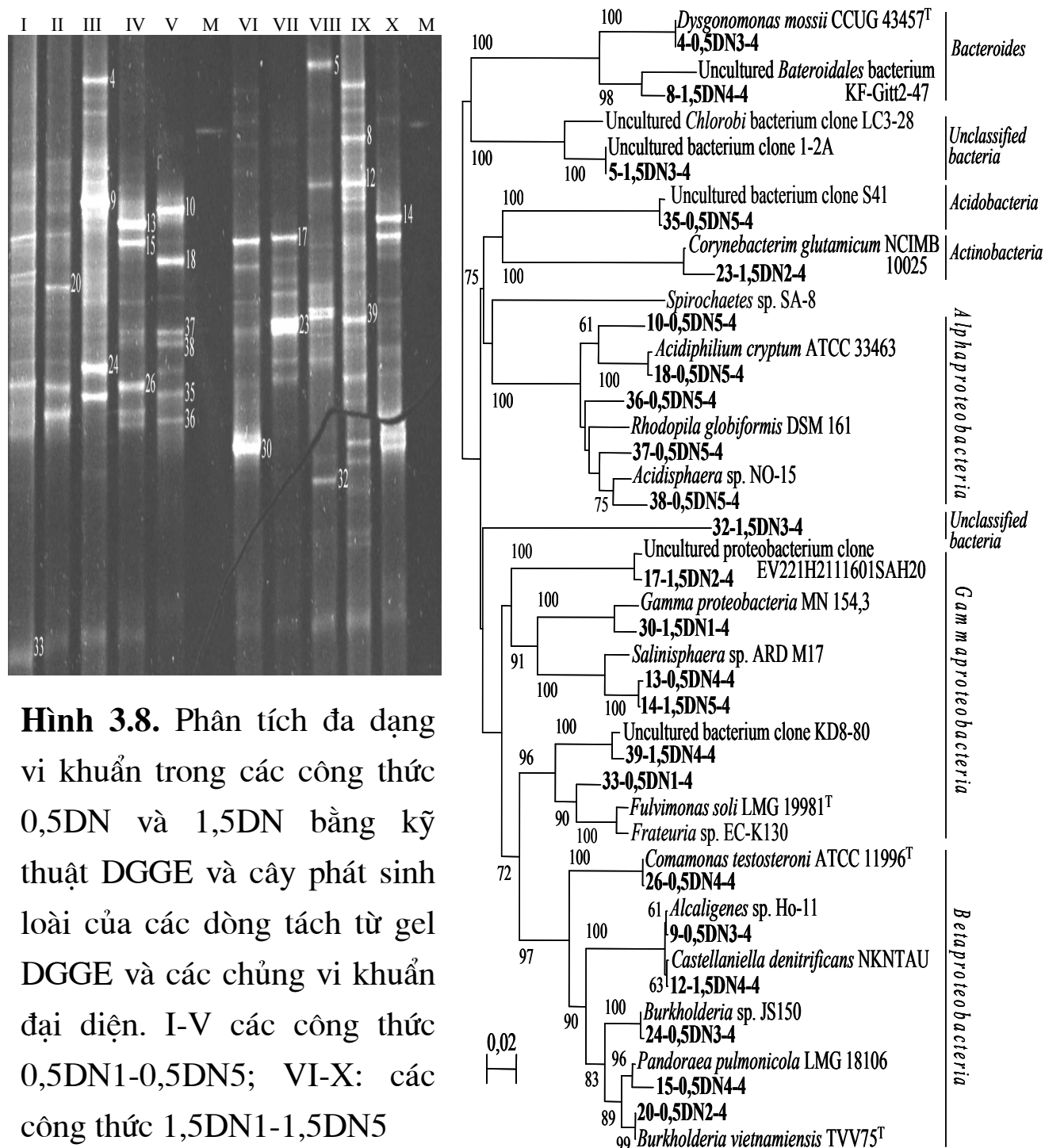
Hình 3.7. Phân tích đa dạng vi khuẩn trong các công thức 1,5DN tẩy độc đất nhiễm CĐHH bằng kỹ thuật SSCP và cây phát sinh loài của các dòng tách từ gel SSCP và các chủng vi khuẩn đại diện. 1-1, 1-2... đến 5-3, tương ứng với ba đợt lấy mẫu.



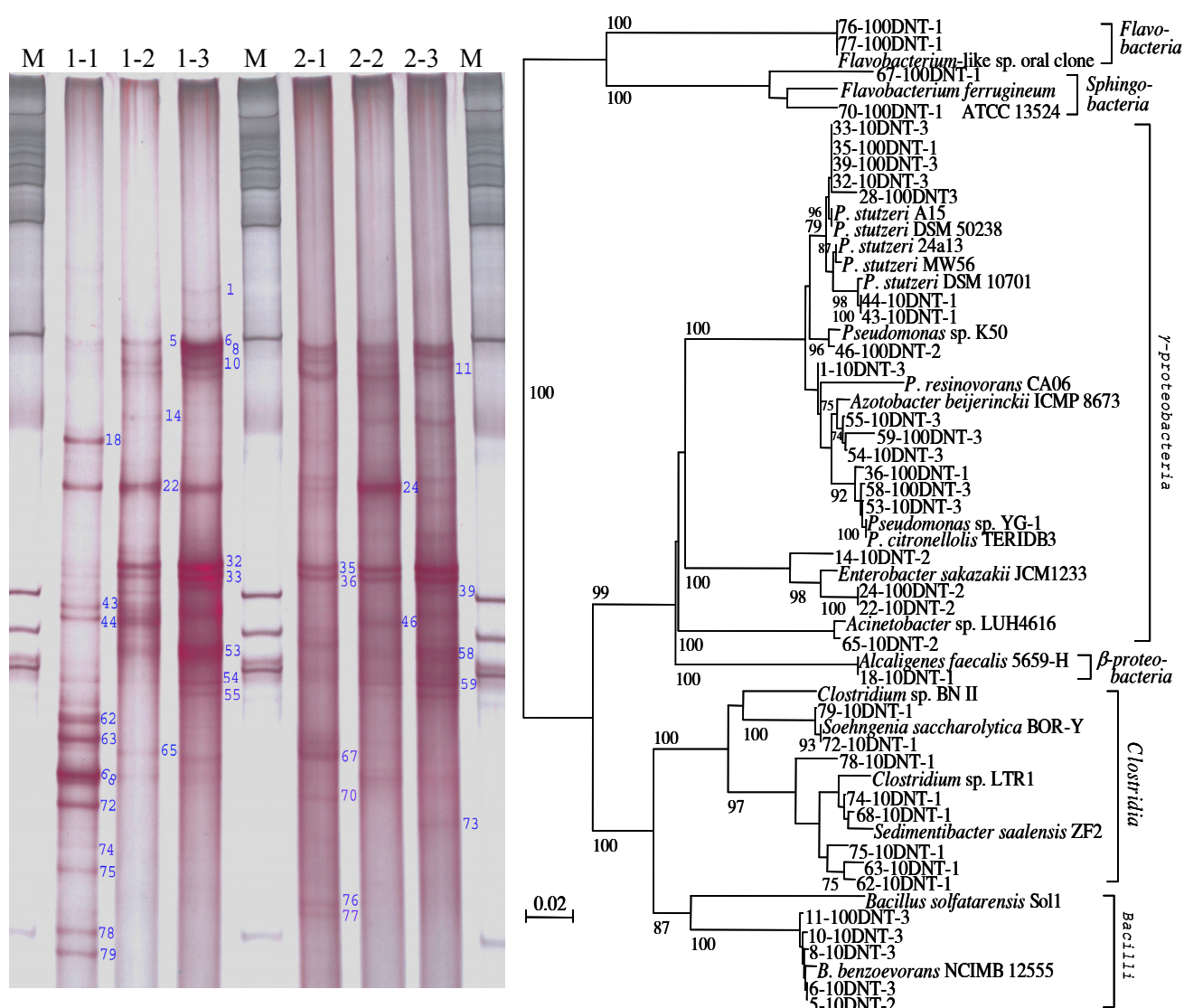
3.3.3. Cấu trúc quần xã vi khuẩn trong các công thức 0,5DN và 1,5DN xác định bằng kỹ thuật DGGE

Ở đợt lấy mẫu thứ tư, đất ở các công thức 0,5DN và 1,5DN đã được phân tích quần xã vi khuẩn trên gel DGGE sử dụng cặp môi Com1, Com2 như ở kỹ thuật SSCP. Đa dạng vi khuẩn trong công thức 0,5DN4 thấp hơn so với ở 3 công thức xử lý còn lại. Hai công thức 0,5DN2 và 0,5DN3 có tỷ lệ cân đối hơn giữa nguồn carbon, ngoài ra đất ở công thức 0,5DN3. Các công thức 1,5DN1, 1,5DN3 và 1,5DN4 có độ đa dạng vi khuẩn cao hơn so với công thức xử lý 1,5DN2 và 1,5DN5 (hình 3.8). Hai mẫu 1,5DN3 và 1,5DN4 có độ ẩm cao hơn các công thức khác, nên đây có thể đây là nguyên nhân ảnh hưởng đến đa dạng vi khuẩn trong 2 công thức xử lý này. Các dòng vi khuẩn không nuôi cấy ở các công thức 0,5DN và 1,5DN thuộc 6 lớp *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*,

Actinobacteria, *Acidobacteria*, *Bacteroides* và vi khuẩn chưa xác định vị trí phân loại (hình 3.8). Vi khuẩn ưa axit, vi khuẩn lớp *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria* là các vi khuẩn chiếm ưu thế. Trong các công thức xử lý đều thấy các chi vi khuẩn *Burkholderia*, *Alcaligenes* và *Comamonas* thuộc họ *Burkholderiaceae*. Ngoài ra, đã phát hiện các dòng tương đồng cao với các vi khuẩn *Corynebacterium* và *Chlorobi*. Như vậy, 2 kỹ thuật SSCP và DGGE sử dụng cùng cặp môi và thu được một số kết quả đa dạng vi khuẩn tương tự.



3.3.4. Biến động cấu trúc quần xã vi khuẩn trong các thử nghiệm chôn lấp tích cực qui mô 10 m³ và 100 m³

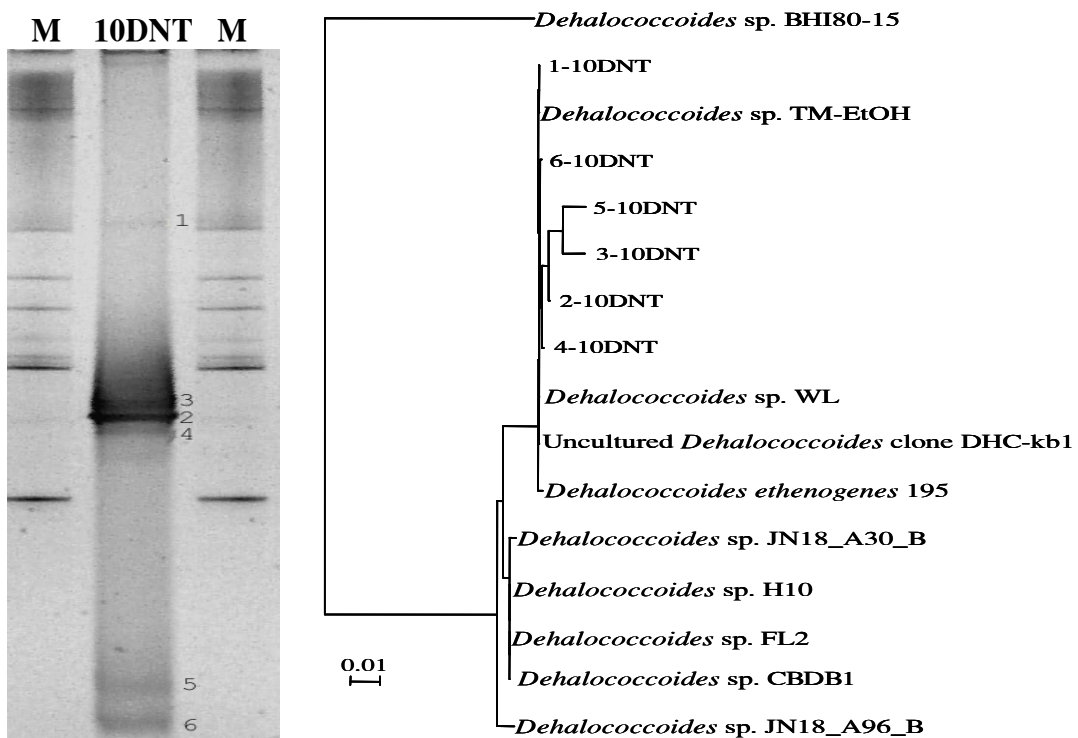


Hình 3.9. Phân tích đa dạng vi khuẩn và cây phát sinh chủng loài các dòng tách từ gel SSCP. 1-1, 1-2 và 1-3 tương ứng các mẫu 10DNT-1, 10DNT-2 và 10DNT-3. 2-1, 2-2 và 2-3 tương ứng các mẫu 100DNT-1, 100DNT-2 và 100DNT-3. M-thang DNA chuẩn X (Roche).

Mức đa dạng vi khuẩn cao nhất ở lần lấy mẫu đầu tiên trong cả hai qui mô xử lý. Số lượng các băng DNA trên gel SSCP cao hơn so với 7 chủng vi khuẩn đã được phân lập (Đặng Thị Cẩm Hà và đtg, 2005). Trình tự 37 băng DNA đã được xác định và thuộc 6 lớp vi khuẩn *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia*, *Sphingobacteria* và *Flavobacteria* (hình 3.9). Nhóm vi khuẩn kỵ khí *Sedimentibacter* được phát hiện trong công thức xử lý khử độc bằng công nghệ “chôn lấp tích cực”. Các vi khuẩn thuộc nhóm *Betaproteobacteria*

chiếm ưu thế trong đất nhiễm chất độc hóa học và trong các công thức 0,5DN và 1,5DN. Tuy nhiên, ở các mẫu 10DNT và 100DNT, nhóm vi khuẩn này đại diện một phần nhỏ quần xã vi khuẩn (hình 3.9) và có thể chiếm ưu thế ở giai đoạn đầu của “chôn lấp tích cực”. Vi khuẩn *Pseudomonas* là nhóm lớn nhất trong các quần xã vi khuẩn trong cả hai công thức 10DNT và 100DNT và một số dòng gần gũi với loài *P. stutzeri* có khả năng phân hủy carbazol và dioxin.

3.3.5. Quần xã vi khuẩn *Dehalococcoides* trong các công thức xử lý



Hình 3.10. Phân tích quần xã vi khuẩn *Dehalococcoides* mẫu 10DNT và quan hệ giữa các dòng tách từ gel DGGE với các vi khuẩn đại diện.

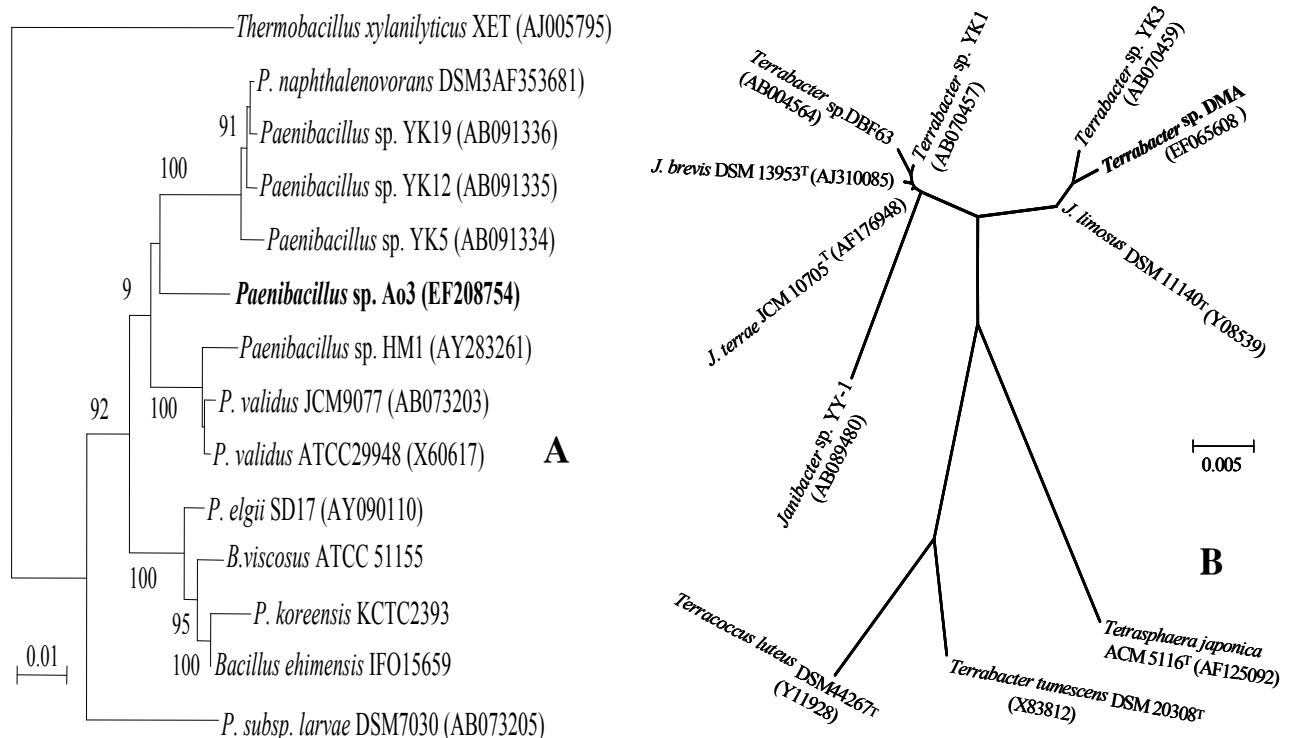
DNA tổng số của 9 mẫu đất (1,5DN1-1,5DN5; 0,5DN3; 0,5DN5, 10DNT và 100DNT) ở đợt lấy mẫu thứ 4 được sử dụng để nhân đoạn 16S rDNA vi khuẩn *Dehalococcoides*. Tuy nhiên, chỉ mẫu 10DNT thu được sản phẩm PCR, có thể do điều kiện kỵ khí tốt hơn các công thức xử lý khác. Sáu băng DNA trong mẫu 10DNT (hình 3.10) tương đồng từ 98% đến 99% với hai chủng vi khuẩn *Dehalococcoides* (195 và CBDB1) có khả năng khử loại clo của dioxin/dibenzofuran.

3.4. Đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn phân lập từ đất và bùn nhiễm chất độc hóa học

3.4.1. Phân lập và xác định khả năng phân hủy dioxin và các hợp chất tương tự của ba chủng vi khuẩn

Các PCDD/F dioxin đặc biệt là 2,3,7,8-TCDD đánh dấu phóng xạ chỉ được sử dụng ở các phòng thí nghiệm đặc biệt nên DBF và DD là hai chất mô hình được sử dụng để nghiên cứu. Hai chủng vi khuẩn HDN3 và DMA được phân lập từ mẫu đất hỗn hợp từ bãi nhiễm và chủng vi khuẩn Ao3 được phân lập từ bùn hồ A (khu vực mẫu A1-A3).

3.4.1.1. Định loại chủng vi khuẩn Ao3



Hình 3.11. Cây phát sinh chủng loại chủng Ao3 (A) và DMA (B) và các chủng vi khuẩn đại diện dựa trên so sánh gen mã hóa 16S rRNA.

Chủng Ao3 có tế bào hình que, kích thước 0,53 - 0,6 μm x 1,67 - 2,8 μm). Trình tự đoạn gen 16S rRNA chủng Ao3 tương đồng 96% với các chủng thuộc chi *Paenibacillus* như HM1, JCM9077 và YK5 (hình 3.11A). Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng Ao3 thuộc về chi *Paenibacillus* và được đặt tên là *Paenibacillus* sp. Ao3.

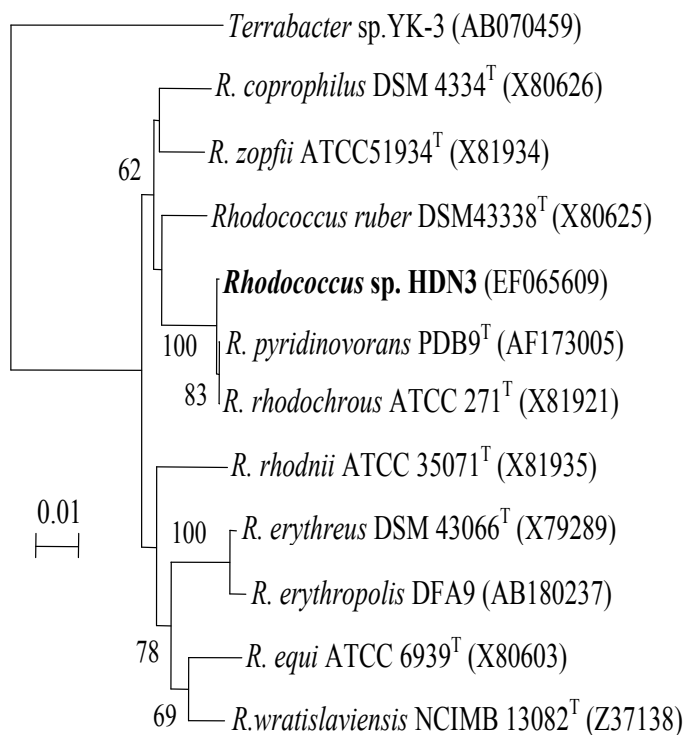
3.4.1.2. Định loại chủng vi khuẩn DMA

Chủng DMA có tế bào hình cầu, kích thước 0,27-0,53 μm . Trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng DMA tương đồng 97,3% với chủng

Janibacter limous DSM 11140^T, 97,5% với *Terrabacter* sp. YK7 (hình 3.11B). Vi khuẩn của 2 chi *Janibacter* và *Terrabacter* có mức tương đồng rất cao khi so sánh trình tự gen 16S rRNA (Lang và đtg, 2003). Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng DMA được xếp vào chi *Terrabacter* và có tên là *Terrabacter* sp. DMA.

3.4.1.3. Định loại chủng vi khuẩn HDN3

Chủng HDN3 có tế bào hình cầu nhám, kích thước 0,27-0,53 μm . Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng HDN3 tương đồng 98,4% với chủng *R. rhodochrous* ATCC 271^T và 94% với chủng SAO101. Vi khuẩn chi *Rhodococcus* sử dụng dioxin gồm các chủng SBUG 271, SAO101, TUT581, YK2 và HA01 (Hiraishi, 2003). Dựa trên đặc điểm hình thái và so sánh trình tự gen 16S rRNA, chủng HDN3 được xếp vào chi *Rhodococcus* và có tên là *Rhodococcus* sp. HDN3.

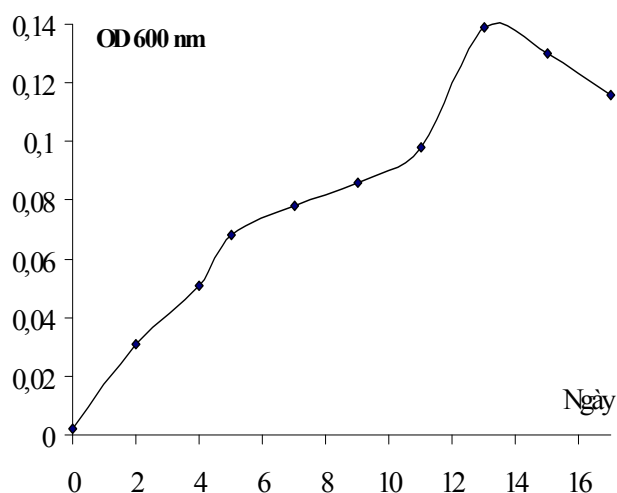


Hình 3.12. Cây phát sinh chủng loại chủng HDN3 và các chủng vi khuẩn *Rhodococcus* đại diện

3.4.1.4. Khả năng sử dụng các một số chất vòng thơm khác

Một số hợp chất vòng thơm là các chất ô nhiễm độc hại trong môi trường. Ba chủng vi khuẩn Ao3, DMA và HDN3 sử dụng được carbazol, biphenyl và không sử dụng 2,4-D, 2,4,5-T và dịch chiết đất chứa dioxin. Hai chủng Ao3 và DMA sử dụng được PCP và 2,4-DCP, hai chủng Ao3 và HDN3 sử dụng được fluorene. Chủng HDN3 sử dụng dioxin và 2-CDD như là nguồn carbon và năng lượng duy nhất, môi trường đục hơn và chuyển

màu vàng. Sinh trưởng của chủng *Rhodococcus* sp. HDN3 trên môi trường muối khoáng chứa dioxin đạt cao nhất sau gần 2 tuần nuôi cấy (hình 3.13).



Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng của chủng *Rhodococcus* sp. HDN3 trên môi trường muối khoáng chứa dioxin.

3.4.1.5. Khả năng phân hủy dibenzofuran của 2 chủng vi khuẩn DMA và HDN3

Sau 24 giờ chủng HDN3 đã phân hủy hoàn toàn 4 mM DBF. Chủng DMA phân hủy 71,54 % và 100 % lượng DBF sau 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy (bảng 3.4). Chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. YK5 phân hủy hoàn toàn 2 mM DBF sau 34 giờ nuôi cấy (Iida và đtg, 2006).

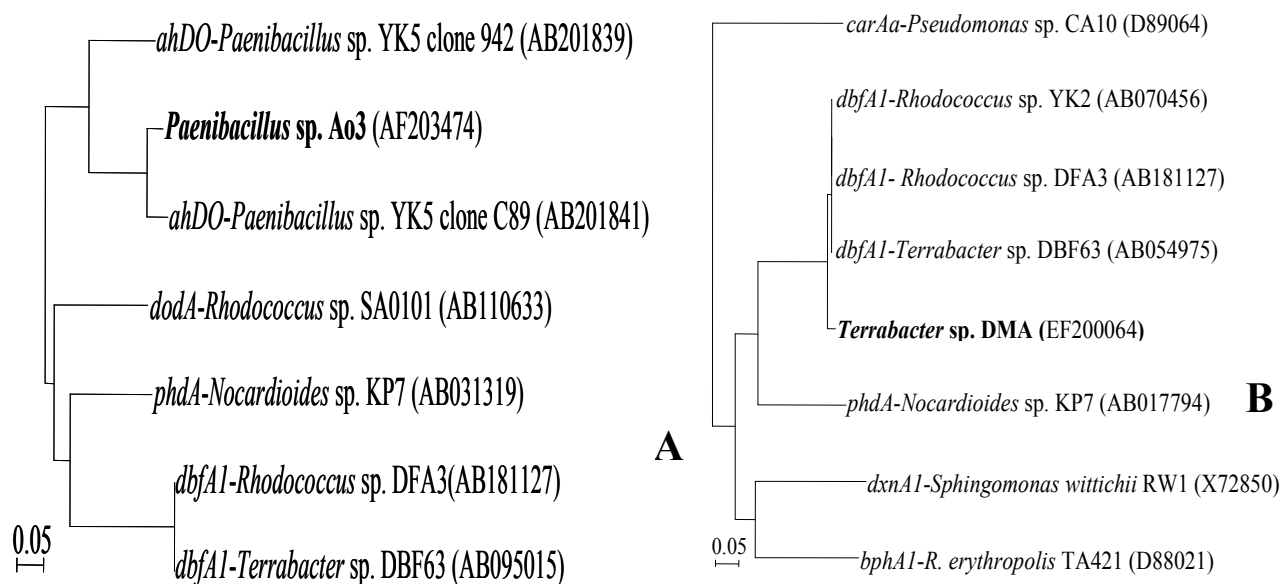
Bảng 3.4. Phân hủy DBF của hai chủng vi khuẩn DMA và HDN3

Thời gian (giờ)	DMA		HDN3	
	Diện tích peak	Phân hủy (%)	Diện tích peak	Phân hủy (%)
0	1.458.824	0	1.777.303	0
24	415.127	71,54	0	100
48	0	100		

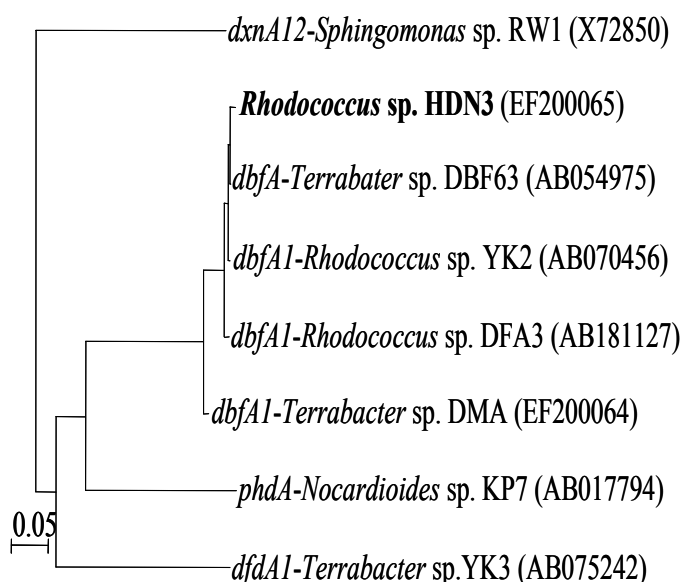
3.4.1.6. Xác định trình tự đoạn gen mã hóa enzym dioxygenase từ ba chủng vi khuẩn Ao3, DMA và HDN3

Oxy hóa kép vị trí góc DD và các hợp chất tương tự được quan tâm đặc biệt vì các sản phẩm trung gian đi tiếp vào chu trình Creb. Cặp môi suy biến DIOXY-F và DIOXY-R đã được thiết kế để nhân đoạn gen mã hóa enzym dioxygenase tham gia bước đầu tiên của phân hủy các hợp chất vòng thơm. Đoạn gen nhân lên từ chủng Ao3 tương đồng 93% với trình tự

dòng PCR C89 gen *ahDO* mã hóa tiểu đơn vị α hydrocarbon dioxygenase của chủng *Paenibacillus* sp. YK5 (hình 3.14A). Trình tự đoạn gen nhân lên từ chủng DMA tương đồng 97% với gen *dbfA1* mã hoá tiểu đơn vị alpha dioxygenase gốc của các chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. DFA3, *Terrabacter* sp. DBF63, *Rhodococcus* sp. YK2 (hình 3.14B).



Hình 3.14. Cây phát sinh chủng loại giữa một số trình tự mã hóa tiểu đơn vị enzym alpha dioxygenase và trình tự nhân lên từ chủng Ao3 (A) và chủng DMA (B) sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R.



Hình 3.15. Cây phát sinh chủng loại giữa một số trình tự gen mã hoá tiểu đơn vị enzym alpha dioxygenase và trình tự nhân lên từ chủng HDN3 sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R.

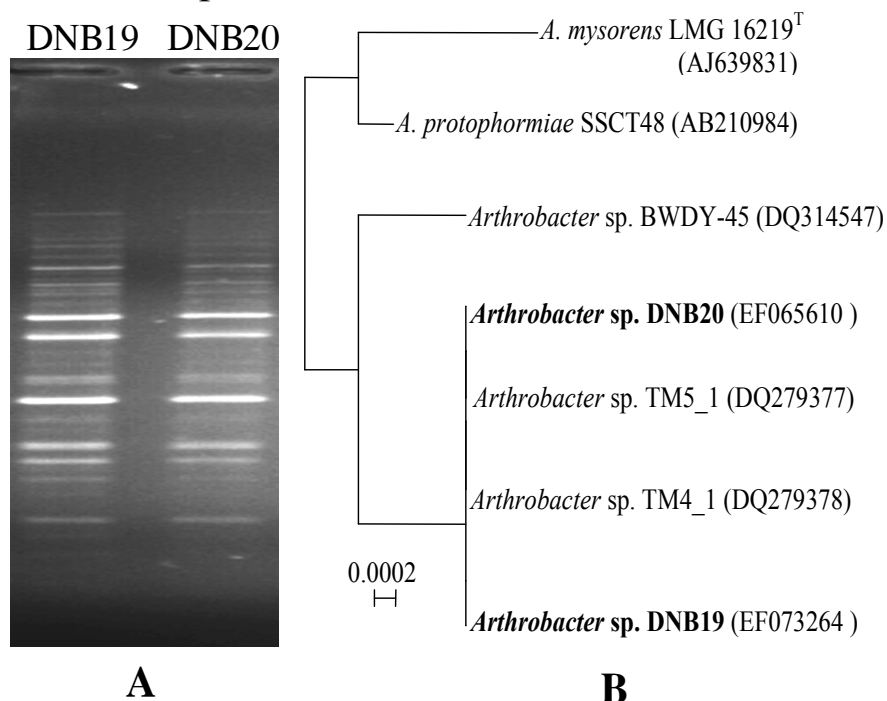
Đoạn gen nhân lên từ chủng HDN3 tương đồng cao với gen *dbfA1* mã hóa tiểu đơn vị alpha dioxygenase gốc của các chủng *Terrabacter* sp. DBF63 (99%) và chủng *Rhodococcus* sp. YK2 (98%) (hình 3.15). Các chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. YK5, *Rhodococcus* sp. (DFA3 và YK2)

và *Terrabacter* sp. DBF63 đã được chứng minh là có khả năng sử dụng DBF và các chất tương tự.

3.4.2. Một số đặc điểm sinh học và gen tham gia chuyển hóa chất diệt cỏ từ các chủng vi khuẩn sử dụng chất diệt cỏ hoặc DBF và các chất tương tự

3.4.2.1. Định loại hai chủng vi khuẩn DNB19 và DNB20 sử dụng 2,4-D và PAH

Hai chủng vi khuẩn DNB19 và DNB20 sử dụng 2,4-D và PAH thuộc bộ sưu tập giống của nhóm thực hiện các đề tài liên quan đến xử lý chất độc hóa học, Viện Công nghệ sinh học. Khuẩn lạc 2 chủng vi khuẩn này có màu vàng chanh. Chủng DNB19 tạo vòng phân giải phenanthrene, anthracene và fluoranthrene và chủng DNB20 chỉ có vòng phân giải đối với phenanthrene. Hai chủng trên giống hệt nhau về các băng DNA (hình 3.16A), trình tự đoạn gen 16S rRNA với 2 chủng *Arthrobacter* sp. (TM4_1 và TM5_1) (hình 3.16B). Như vậy, 2 chủng vi khuẩn DNB19 và DNB20 thuộc chi *Arthrobacter* và có tên là *Arthrobacter* sp. DNB19 và *Arthrobacter* sp. DNB20.

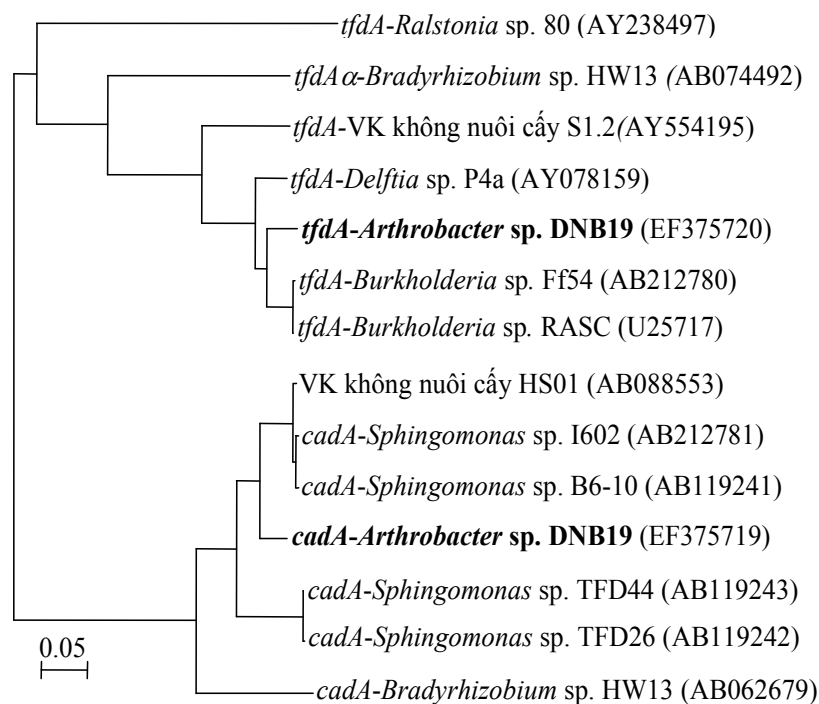


Hình 3.16. Điện di đồ sản phẩm BOX-PCR (A) và cây phát sinh chủng loại hai chủng DNB19, DNB20 và một số chủng đại diện chi *Arthrobacter*

3.4.2.2. Sự tồn tại của các gen *tfdA* và *tftA(cadA)* ở chủng DNB19

Sản phẩm PCR nhân gen *cadA* từ chủng DNB19 tương đồng 93% với gen *cadA* của chủng *Sphingomonas* sp. B6-10 (hình 3.17). Các nghiên cứu trước đây mới chỉ phát hiện gen *cadAB* trong chi vi khuẩn *Sphingomonas* và *Bradyrhizobium* (Itoh và đtg, 2004). Trình tự axit amin suy diễn từ đoạn

gen *cadA* chủng *Arthrobacter* sp. DNB19 tương đồng 48% với TftA của chủng vi khuẩn *B. phenoliruptrix* AC1100.



Hình 3.17. Mối quan hệ phát sinh chủng loại gen *tfdA* và *cadA* ở chủng *Arthrobacter* sp. DNB19 và các vi khuẩn khác.

Trình tự sản phẩm nhân gen *tfdA* từ chủng DNB19 tương đồng 94% với *tfdA* của các chủng vi khuẩn *Burkholderia* sp. RASC, *Burkholderia* sp. Ff54 (hình 3.17).

3.4.2.3. Sự tồn tại của các gen *tfdA* và *tftA(cadA)* trong ba chủng vi khuẩn Ao3, DMA và HDN3

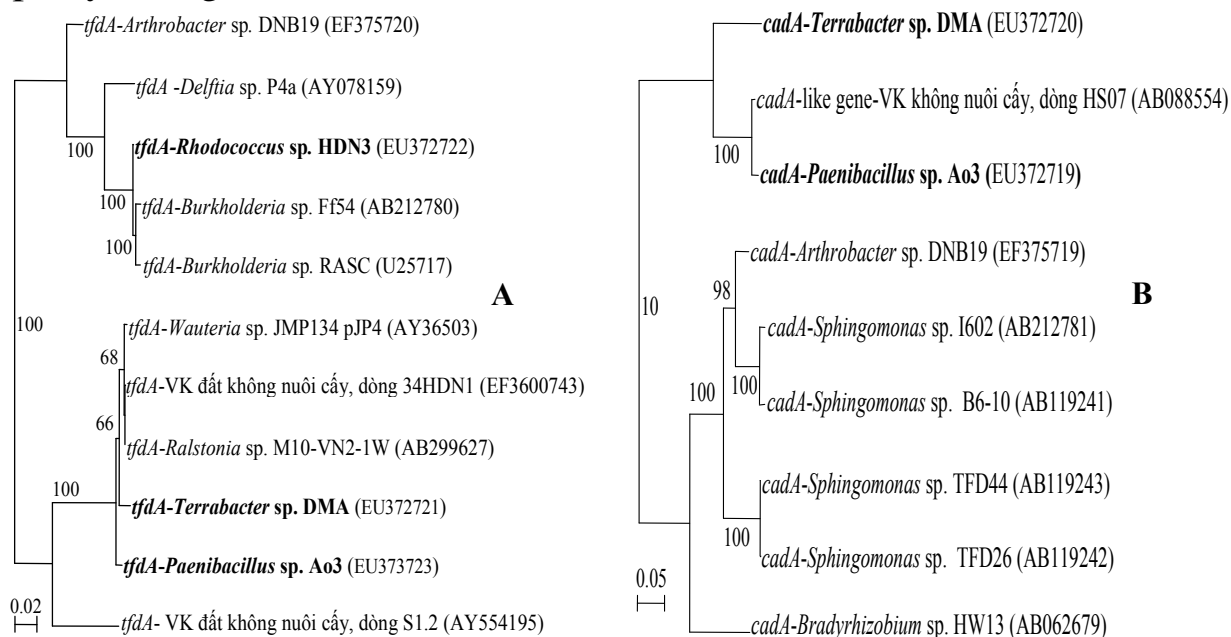
3.4.2.3.1. Trình tự đoạn gen *tfdA*

Đoạn gen *tfdA* của 2 chủng Ao3 và DMA tương đồng 98% với trình tự *tfdA* ở chủng *C. negator* JMP134. Đoạn gen *tfdA* ở chủng HDN3 tương đồng 99% với đoạn gen *tfdA* của chủng *Burkholderia* sp. RASC (hình 3.18A).

3.4.2.3.2. Trình tự đoạn gen giống *cadA*

Chỉ 2 chủng Ao3 và DMA thu được sản phẩm PCR nhân đoạn gen *cadA* và đã được xác định trình tự. Trình tự nucleotide đoạn gen giống *cadA* ở 2 chủng Ao3 và DMA chỉ tương đồng cao với đoạn gen giống *cadA* dòng HS07 từ DNA mẫu bùn hoạt tính có bổ sung 2,4-D, mức tương đồng lần lượt là 99% và 86% (hình 3.18B). Mức tương đồng trình tự axit amin suy diễn từ đoạn gen giống *cadA* ở 2 chủng Ao3, DMA và 2 chủng vi khuẩn đại diện *Bradyrhizobium* sp. HW13, *B. phenoliruptrix* AC1100 lần lượt là 54%, 43%, 51% và 37%. Các chất diệt cỏ 2,4-D, 2,4,5-T được đưa vào sử dụng từ gần 70 năm qua và nhiều nghiên cứu đã chứng minh được quá trình chuyển gen phân hủy 2,4-D trong tự nhiên giữa các vi sinh vật có

khả năng sử dụng 2,4-D sang các vi sinh vật đất bình thường khác (de Liphay và đtg, 2001).



Hình 3.18. Cây phát sinh chủng loại gen *tfdA* (A) và gen giống *cadA* (B) của 3 chủng vi khuẩn Ao3, DMA, HDN3 và một số chủng đại diện.

Như vậy, kết quả trong nghiên cứu này cũng góp thêm bằng chứng về sự trao đổi vật liệu di truyền trong đó có các gen tham gia phân hủy các chất diệt cỏ trong các vi khuẩn ở đất nhiễm chất độc hóa học tại sân bay Đà Nẵng.

KẾT LUẬN

1. Tại bãi nhiễm chất độc hóa học ở sân bay Đà Nẵng đất ô nhiễm ở mức độ thấp hơn có sự đa dạng vi sinh vật cao hơn. Vi khuẩn trong đất nhiễm thuộc các lớp *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, α , β và γ -*proteobacteria* và vi khuẩn họ *Burkholderiaceae* chiếm ưu thế. Các chi vi nấm phổ biến gồm *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Coniochaeta*, *Phacidium*, *Anguillospora*, *Nectria*, *Tetrachaetum*. Số lượng bản sao gen *tfdA* trong đất nhiễm từ $1,06 \times 10^5$ đến $5,99 \times 10^6$ MPN/g đất và gen *tfdA* lớp I và II chiếm ưu thế.
2. Hồ A chịu ảnh hưởng trực tiếp nước từ bãi nhiễm có sự đa dạng vi khuẩn kỵ khí tùy tiện và *Dehalococcoides* cao hơn so với 2 hồ B và hồ C ít bị ảnh hưởng. Một số dòng vi khuẩn ở bùn hồ thuộc các lớp α -*proteobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Sulfuricurvum*, *Fusobacteria*, *Nitrospiraceae* và vi khuẩn chưa xác định.
3. Đã có sự thay đổi cấu trúc quần xã vi khuẩn ở trong các công thức xử lý và giữa các đợt lấy mẫu. Vi khuẩn họ *Burkholderiaceae* và vi khuẩn chi

Pseudomonas chiếm ưu thế ở các công thức xử lý 0,5DN và 1,5DN. Vi khuẩn lớp *Betaproteobacteria* chiếm tỷ lệ thấp và vi khuẩn *Pseudomonas* là nhóm ưu thế trong hai công thức 10DNT và 100DNT. Các vi khuẩn kỵ khí và kỵ khí tùy tiện đã được phát hiện ở các công thức 0,5DN và 1,5DN và chiếm ưu thế ở hai công thức 10DNT và 100DNT. Đã phát hiện được 6 dòng vi khuẩn khử loại clo *Dehalococcoides* ở công thức 10DNT.

4. Ba chủng vi khuẩn sử dụng DBF Ao3, DMA và HDN3 thuộc các chi *Paenibacillus*, *Terrabacter* và *Rhodococcus*. Ba chủng này sử dụng được một số hợp chất vòng thơm. Chủng HDN3 sử dụng dioxin và 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin như là nguồn carbon và năng lượng duy nhất. Chủng HDN3 và DMA phân hủy hoàn toàn 4 mM DBF sau 24 và 48 giờ nuôi cấy. Các đoạn gen mã hóa dioxygenase của 3 chủng Ao3, DMA và HDN3 tương đồng cao với gen *ahDO* và *dbfA1* mã hóa enzym dioxygenase vị trí gốc ở các chủng có cùng vị trí phân loại.
5. Đoạn gen *tfda* của 2 chủng vi khuẩn Ao3 và DMA thuộc lớp I gen *tfda* và đoạn gen *tfda* ở chủng vi khuẩn HDN3 thuộc lớp II gen *tfda*. Đoạn gen giống *cadA* ở 2 chủng vi khuẩn Ao3 và DMA tương đồng 99% và 86% với trình tự đoạn gen giống *cadA* dòng HS07 từ DNA mẫu bùn hoạt tính có bổ sung 2,4-D.
6. Hai chủng vi khuẩn DNB19 và DNB20 sử dụng 2,4-D và PAH giống hệt nhau về trình tự đoạn gen 16S rRNA, sản phẩm BOX-PCR và thuộc chi *Arthrobacter*. Trình tự đoạn gen *tfda* ở chủng DNB19 thuộc lớp II gen *tfda*. Trình tự đoạn gen *cadA* ở chủng DNB19 tương đồng cao với gen *cadA* từ chủng *Sphingomonas* sp. B6-10. Trình tự axit amin suy diễn gen *cadA* của chủng DNB19 tương đồng 48% với trình tự axit amin TftA của chủng vi khuẩn phân hủy 2,4,5-T *B. phenoliruptrix* AC1100.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu biến động vi nấm trong các công thức khử độc bằng phân hủy sinh học.
- Phân loại bốn chủng vi khuẩn Ao3, DMA, HDN3 và DNB19 đến loài hoặc dưới loài.
- Phân tích các sản phẩm phân hủy DD và 2-CIDD của chủng HDN3 và tìm hiểu khả năng ứng dụng của bốn chủng vi khuẩn Ao3, DMA, HDN3 và DNB19 trong xử lý ở bioreactor khử độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin.