

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DIOXIN VÀ PHÂN LOẠI GIEN MÃ HÓA DIOXIN DIOXYGIENAZA CỦA HỖN HỢP CHỦNG VI KHUẨN KỊ KHÍ KHÔNG BẮT BUỘC SETDN20 TỪ ĐẤT NHIỄM ĐỘC HÓA HỌC TẠI ĐÀ NẴNG

NGUYỄN THỊ SÁNH, NGHIÊM NGỌC MINH,
NGUYỄN QUỐC VIỆT, ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

Viện Công nghệ sinh học

Hiện nay, đất tại một số “điểm nóng” ở các căn cứ quân sự trước đây của Mỹ vẫn bị ô nhiễm nặng các chất diệt cỏ, polycloinated dibenzodioxin (PCDDs), polycloinated dibenzofuran (PCDFs) và các hợp chất khác. Tẩy độc các điểm nóng ở Đà Nẵng bằng công nghệ phân hủy sinh học đang được tiến hành và cho kết quả rất khả quan, phương pháp này có giá thành thấp và thân thiện với môi trường. Vai trò của tập đoàn vi sinh vật hiếu khí đã được nghiên cứu còn vi sinh vật kị khí và kị khí không bắt buộc vẫn chưa được quan tâm nhiều. Vì khuẩn kị khí và kị khí không bắt buộc đóng một vai trò đặc biệt trong quá trình loại khử halogen các hợp chất hữu cơ chứa halogen khó phân hủy trong đó có dioxin. Điều kiện của quá trình khử loại halogen nói chung và clo nói riêng được thực hiện trong môi trường hoạt động của vi khuẩn kị khí như: vi khuẩn khử sắt, khử sunfat, vi khuẩn sinh methan [12, 13]. Từ các nghiên cứu đã được công bố, chúng tôi đã thống kê được một số loài có khả năng loại clo trong điều kiện kị khí: *Dehalobacter*, *Desulfomonile*, *Desulfitobacterium*, *Dehalospirillum*, *Dehalobacterium*, *Dehalococcoides* [3, 5]. Phân hủy hiếu khí DD và DBF diễn ra theo hai cơ chế oxi hóa vị trí bên và vị trí góc của nhân thom, trong đó oxi hóa đầu tiên ở vị trí góc được thực hiện bởi enzym dioxygenaza, quá trình này chuyển hóa hoàn toàn DD và DBF [1, 4]. Ở Việt Nam, công nghệ chôn lấp tích cực là tổ hợp của phương pháp cô lập hấp phụ và phân hủy sinh học đã được nghiên cứu và đang được triển khai khử độc “điểm nóng” nhiễm chất diệt cỏ/dioxin. Tuy nhiên, để nâng cao hiệu quả khử độc của qui trình công nghệ và áp dụng rộng rãi ở các “điểm nóng” khác cần có thêm hiểu biết sâu về đa dạng, khả năng phân hủy sinh học và

các gen tham gia quá trình phân hủy các chất độc bới tập đoàn vi sinh vật bản địa.

Để tìm hiểu vai trò của vi sinh vật trong điều kiện chôn lấp tích cực mà ở đó môi trường chủ yếu là kị khí và kị khí không bắt buộc, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy tập đoàn vi sinh vật kị khí ở điều kiện vẫn có ít oxy trong môi trường. Khả năng phân hủy các chất độc đặc biệt là 2,3,7,8-TCDD của các vi sinh vật bản địa đã được xác định thông qua hỗn hợp chủng vi khuẩn kị khí không bắt buộc SETDN20. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu khả năng phát triển cũng như khả năng phân hủy của vi sinh vật trên môi trường chứa dịch chiết đất (chứa 2,3,7,8-TCDD) đồng thời nghiên cứu sự đa dạng của hỗn hợp chủng. Sự phát gien chức năng dioxin dioxygenaza trong hỗn hợp chủng vi khuẩn kị khí không bắt buộc SETDN20 cũng đã được công bố trong bài báo này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Hỗn hợp chủng SETDN20 được phân lập bằng phương pháp làm giàu nhiều lần từ lô đất xử lý tẩy độc bằng phân hủy sinh học DN100T ở sân bay Đà Nẵng. Hỗn hợp chủng này được nuôi ở điều kiện kị khí không sử dụng hỗn hợp khí N₂, CO₂ và H₂ trong tủ nuôi cấy kị khí chuyên dụng (có nghĩa là vi sinh vật được nuôi ở điều kiện kị khí không bắt buộc).

Cặp mồi sử dụng cho việc khuyếch đại đoạn gien 16S ARN ribosom phục vụ nghiên cứu đa dạng hỗn hợp chủng vi khuẩn đất bằng kỹ thuật PCR-DGGE:

341F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')
- có gắn kẹp GC

907R (5'-CCGTCATTCTTTRAGTTT-3')

Cặp mồi suy diễn sử dụng nhân đoạn gien mã hóa enzym phân hủy dioxin :

DF (5' - TGYASNTAYCAYGGVTGG -3'),

DR (5' - TBVGGNCCVYKNGGVTGCC - 3')

Cặp mồi trên đã được sử dụng để nhân gien mã hóa cho enzym dioxin dioxygenaza (khoảng hơn 700 bp) của hồn hợp chủng SETDN20. Cặp mồi suy diễn này được thiết kế dựa trên các trình tự đã công bố [8] và được sử dụng để tìm hiểu gien mã hóa cho enzym dioxin dioxygenaza có mặt trong hồn hợp chủng SETDN20 nuôi ở điều kiện kị khí không bắt buộc.

Kit TA Cloning^(R) có vector pCR2.1, T₄ ADN ligaza, tế bào kh้า biến *E. coli* INV F' của hãng InvitrogenTM. Xác định trình tự gien bằng máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Gentic Analyzer. Trình tự nucleotit được xử lý bằng phần mềm ABI PRISM 3100 Avant Data Collection v1.0 và ADN Sequencing Analysis.

2. Phương pháp

a. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Phân lập chủng vi khuẩn theo phương pháp làm giàu. Mẫu đất ban đầu chưa xử lý tẩy độc (mẫu đối chứng) và mẫu đang xử lý bằng công nghệ phân hủy sinh học được làm giàu trên môi trường xử lý có bổ sung dịch chiết đất (tách từ đất nhiễm chất độc hóa học) làm nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Quá trình làm giàu được tiến hành 3 lần, thể tích bình nuôi cấy kị khí là 125 ml, nuôi ở điều kiện tĩnh, trong bóng tối ở 30°C. Nguồn cacbon và năng lượng sử dụng cho nghiên cứu này là dịch chiết đất vì nó chứa chủ yếu đồng phân 2,3,7,8-TCDD là đồng phân độc nhất với hệ số độc là 1, các đồng phân dioxin, furan chứa clo khác cũng đã phân tích được. Dịch chiết đất được tách từ mẫu đất Đà Nẵng theo phương pháp Envirograd [7].

b. Nghiên cứu hình thái tế bào vi khuẩn

Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn bằng kính hiển vi điện tử quét JSML 5410 với sự cộng tác của Viện 69, Bộ Tư lệnh Lăng.

c. Phương pháp tách ADN tổng số, PCR và nhân dòng đọc trình tự

Tách ADN tổng số theo phương pháp của Sambrook và Russel [11] và nhân đoạn gien 16S ARN ribosom có độ dài khoảng 550 bp bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 907R, 341F kẹp GC. Điều kiện PCR được tiến hành như đã mô tả bởi Nguyễn Thanh Thủy [9] với nhiệt độ gắn mồi là 65°C.

Nhân đoạn gien mã hóa cho enzym dioxin - dioxygenaza có độ dài khoảng 700 bp bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi DF, DR với thể tích là 25 µl, thành phần phản ứng gồm 2,5 µl PCR buffer 10x, 4 mM MgCl₂, 0,25 mM hồn hợp dNTPs, 20 pM mỗi loại mồi DF và DR, 1 đơn vị Taq ADN polymeraza, nhiệt độ gắn mồi là 50°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa nồng độ 0,8%, sau đó được gắn trực tiếp vào vector pCR^R 2.1 nhờ T4-ADN ligaza; sản phẩm gắn được biến nạp vào chủng *E. coli* INV F' và chọn lọc trên môi trường LB đặc có chứa 100 mg/l ampicillin, nuôi cấy ở 37°C qua đêm. Tách chiết và làm sạch ADN plasmid theo Sambrook và Russel [11].

d. Phương pháp điện di gel gradient biến tính (DGGE) để xác định mức độ đa dạng của vi sinh vật trong tập đoàn

Sau khi thu được sản phẩm PCR đảm bảo chất lượng, chúng tôi đã sử dụng phương pháp điện di kiểm tra trên gel biến tính, nồng độ của gel là 6% với dải biến tính từ 20-70% để nghiên cứu sự đa dạng của tập đoàn vi sinh vật [9].

e. Phương pháp xác định độ tồn lưu của PCDDs và PCDFs

Sự thay đổi thành phần hóa học (PCDDs/PCDFs) trong các mẫu được tách chiết và phân tích theo phương pháp EPA 8270 bằng GC/MS (Hewlett Packard 6890 GC/MSD 5972 A với khối phô EPA 98 thư viện khối phô, quét từ 35 đến 500 amu) và so sánh với thời gian lưu và phô khối lượng các mẫu chất chuẩn.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sự phát triển và hình thái tế bào của hồn hợp vi khuẩn kị khí không bắt buộc SETDN20



A

B

Hình 1. Sự phát triển (A) và hình thái tế bào (B) của hỗn hợp vi khuẩn SETDN20

Để nghiên cứu hỗn hợp chủng vi khuẩn này, chúng tôi chỉ sử dụng phương pháp nuôi cấy khí không có sự hỗ trợ của phòng nuôi cấy khí và các loại khí cần thiết. SETDN20 đã được làm giàu ba lần. Các chủng sạch không thể tách được ra khỏi hỗn hợp nên chúng tôi đã nghiên cứu cả hỗn hợp chủng của SETDN20. Nhìn vào hình thái tế bào bằng kính hiển vi điện tử quét ở hình 1 ta thấy, có ít nhất hai loài vi khuẩn trong

đó tồn tại một loại vi khuẩn chiếm ưu thế hình thái giống như đại diện của *Sarcina*.

2. **Khả năng sử dụng dioxin của hỗn hợp vi khuẩn SETDN20**

Độ tồn lưu của dioxin và furan trong dịch nuôi cấy của mẫu có SETDN20 và mẫu đối chứng (không có vi sinh vật) được trình bày ở bảng 1.

*Bảng 1***Khả năng sử dụng các đồng phán PCDDs và PCDDFs của hỗn hợp vi khuẩn SETDN20**

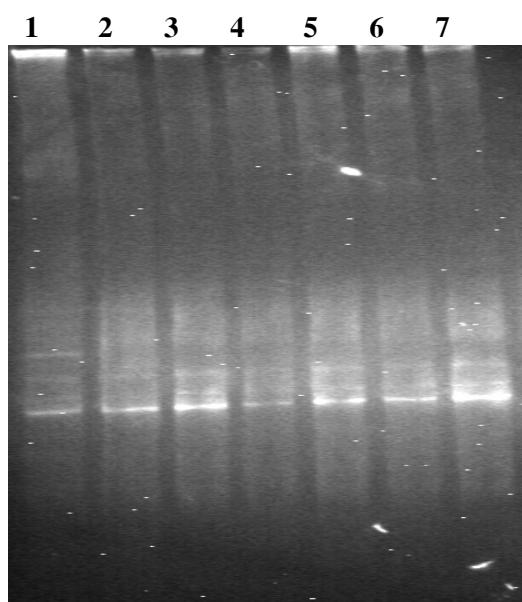
Tên đồng phán	Nồng độ độc tương đương (pg TEQ/1 ml)	
	Đối chứng không có vi sinh vật	Hỗn hợp vi khuẩn kị khí SETDN20
PCDDs		
2,3,7,8-TCDD	4272,774	3506,466
1,2,3,7,8 PeCDD	13,876	11,476
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,22	0,177
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0,956	0,834
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0,566	0,495
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0,356	0,307
1,2,3,4,6,7,8,9 OCDD	0,89	0,737
PCDFs		
2,3,7,8 TCDF	8,433	7,313
1,2,3,7,8 PeCDF	0,040	0,037
2,3,4,7,8 PeCDF	0,923	0,744
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,098	0,082
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,036	0
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0	0
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0,031	0,038
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0,038	0,031
1,2,3,4,7,8,9 HpCDD	0	0
1,2,3,4,6,7,8,9 OCDF	0,002	0,001
Tổng độ độc	4299,243	3528,742
Phần trăm phân hủy	0	17,9%

Hỗn hợp chủng SETDN20 sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường xử lý có bổ sung dịch chiết đất đã loại bỏ 17,9% tổng độ độc, trong đó 2,3,7,8-TCDD giảm từ 4299,243 pg TEQ/ml xuống còn 3528,742pg TEQ/ml. So với một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dioxin hiểu khí đã công bố như *Streptomyces danangiensis* XKDN19 có khả năng phân hủy 85,97% lượng 2,3,7,8-TCDD sau 14 ngày với hàm lượng ban đầu 333 pg/ml [6] thì khả năng phân hủy của hỗn hợp chủng SETDN20 thấp hơn khá nhiều. Bên cạnh đó, các chủng thuộc chi *Nocardiopsis* và *Bacillus megaterium* được phân lập từ đất trang trại có khả năng phân hủy 2,3,7,8-TCDD ở nồng độ 5 ppb [10]. Tuy nhiên do dioxin hòa tan trong nước rất thấp, nó tích tụ nhiều trong các trầm tích thiếu oxy, vì vậy phân hủy dioxin ở điều kiện không phải hiểu khí cũng rất có ý nghĩa. Ví dụ như chủng vi khuẩn kị khí *Dehalococcoid* CBDB1 được phân lập từ trầm tích có khả năng chuyển hóa 1,2,3-TrCDD và 1,3,4-TrDD để tạo thành các hợp chất ít độc hơn. Sau 57 ngày nuôi cấy ở điều kiện kị khí hơn 60% lượng 1,2,3-TrCDD ở nồng độ ban đầu 25 μ M và 37% lượng 1,3,4-TrCDD ở nồng độ ban đầu 60 μ M đã chuyển hóa thành 2-MCDD [2].

Các kết quả nghiên cứu khả năng sử dụng dioxin cho thấy, SETDN20 thuộc vi sinh vật sử dụng nguồn chất độc này như nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Như vậy, hỗn hợp chủng SETDN20 có khả năng sử dụng dioxin và chủ yếu là đồng phân 2,3,7,8-TCDD thực sự có ý nghĩa trong nghiên cứu xây dựng qui trình công nghệ tẩy độc dioxin. Vì vậy, hỗn hợp chủng này đã được sử dụng để nghiên cứu sự đa dạng và gien chức năng dioxin dioxygenaza.

3. Sự đa dạng của vi sinh vật trong hỗn hợp chủng SETDN20

Bằng quy trình tách chiết ADN của Sambrook và Russel (2001), chúng tôi đã thu nhận được ADN tổng số của hỗn hợp chủng SETDN20 đủ cả về số lượng và chất lượng được dùng cho những nghiên cứu tiếp theo. Sản phẩm ADN thu được làm khuôn cho phản ứng PCR nhân đoạn gien 16S ARN ribosom có độ dài khoảng 550 bp bằng kỹ thuật PCR như đã mô tả trong phần phương pháp và sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel biến tính DGGE để nghiên cứu sự đa dạng của hỗn hợp chủng. Kết quả trên gel cho ta thấy, có 3 băng khác nhau trong hỗn hợp chủng thể hiện ở hình 2 (giếng số 7).

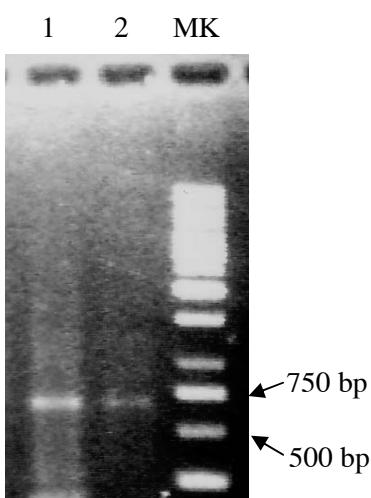


Hình 2. Ảnh điện di trên gel gradient biến tính (Denature gradient gel electrophoresis - DGGE) mẫu hỗn hợp chủng SETDN20 giếng cuối (số 7) (các giếng 1-6 là kết quả của mẫu khác)

Như vậy quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét chúng ta chỉ nhìn thấy có hai loài, còn dùng phương pháp điện di trên gel gradient biến tính cho ta thấy rõ hơn về sự có mặt các loài trong hỗn hợp chủng, gồm có 3 băng có thể tương ứng với ba loài khác nhau. Cần có các nghiên cứu về xác định trình tự nucleotit để biết tên và vị trí phân loại của các băng trên. Trong hỗn hợp chủng kị khí không hoàn toàn này có khả năng sử dụng dioxin, vậy vai trò của cả hỗn hợp này như thế nào? Trước tiên chúng tôi nghiên cứu gien mã hóa cho enzym dioxin dioxygenaza của hỗn hợp SETDN20 bằng cặp mồi DR, DF.

a. *Nhân dòng và xác định trình tự gien dioxin dioxygenaza của SETDN20*

Như trong phần phân lập mẫu và nghiên cứu sự đa dạng đã đề cập, SETDN20 có thể là hỗn hợp gồm 3 chủng mà cho đến nay chúng tôi vẫn chưa thể tách và làm sạch thành chủng đơn được. Nhưng hỗn hợp 3 chủng này lại có khả năng phân hủy dịch chiết từ đất nhiễm dioxin (chủ yếu là thành phần 2,3,7,8-TCDD), vì vậy chúng tôi tiến hành xác định gien mã hóa cho enzym dioxin dioxygenaza trong hỗn hợp chủng SETDN20. ADN tổng số của hỗn hợp chủng SETDN20 sau khi tách chiết và làm sạch được dùng làm khuôn cho phản ứng nhân đoạn gien mã hóa dioxin dioxygenaza với cặp mồi môi DF và DR như đã nêu ở phần phương pháp.



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR của gien mã hóa cho enzym dioxin deoxygienaza ở SETDN20 MK. Marker phân tử 1kb; giếng 1. sản phẩm PCR lần 1; giếng 2. sản phẩm PCR lần 2.

Sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng hơn 700 bp và khá đặc hiệu (hình 3, giếng 1, 2). Sau đó, sản phẩm PCR này được gắn vào vector pCR 2.1 và biến nạp vào tế bào *E.coli* INV F'. Sản phẩm này được kiểm tra bằng enzym giới hạn *EcoRI*. Kết quả đã chỉ ra rằng, một băng ADN có kích thước khoảng 700 bp đã được phát hiện. Để khẳng định rõ hơn điều này ADN plasmid có mang đoạn gien 16S ARN ribosom có kích thước khoảng 700 bp (sản phẩm PCR) đã được sử dụng làm khuôn và chạy lại PCR ở cùng một điều kiện phản ứng như lần đầu. Kết quả vẫn chỉ nhận được một đoạn ADN (sản phẩm PCR) có kích thước như ban đầu khoảng 700 bp (hình 3, giếng 2).

ADN plasmid có mang sản phẩm PCR như mong muốn đã được chọn để tách và làm sạch lượng lớn phục vụ cho đọc trình tự. Trình tự gien dioxin dioxygenaza của SETDN20 được xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyse, sử dụng bộ Kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing. Kết quả đã nhận được một đoạn trình tự nucleotit khoảng hơn 700 bp rõ ràng. Trình tự đoạn gien này đã được đưa vào khung đọc mở (ORF) để dịch mã ra trình tự axit amin. Trình tự này đã được so sánh với các trình tự axit amin trong Ngân hàng Protein thế giới EMBL. Kết quả cho thấy enzym này có độ tương đồng cao với nhóm enzym phenylpropionate dioxygenaza (99%). Điều này chứng tỏ, trong hỗn hợp vi khuẩn SETDN20 đã có mang nhóm gien mã hóa cho các enzym dioxin dioxygenaza mà chúng tôi rất quan tâm trong công nghệ tẩy độc dioxin.

III. KẾT LUẬN

1. Hỗn hợp chủng SETDN20 có thể bao gồm 3 loài khác nhau và có khả năng phát triển trên nguồn dịch chiết đất với hàm lượng cao trong điều kiện kị khí không bắt buộc.

2. Sau hai tháng nuôi tinh ở nhiệt độ 30°C, hỗn hợp chủng SETDN20 đã loại bỏ 17,9% tổng độ độc trong đó có 2,3,7,8-TCDD.

3. Trong hỗn hợp chủng SETDN20 chứa gien mã hóa enzym dioxin dioxygenaza. Enzym này có độ tương đồng cao với nhóm enzym phenylpropionate dioxygenaza (99%). Ở điều kiện kị khí không bắt buộc, gien mã hóa cho các

enzim dioxygenaza tham gia vào quá trình cắt vòng thơm vẫn có mặt.

Lời cảm ơn: kinh phí thực hiện công trình này thuộc về tài trợ độc lập của Chương trình 33 giai đoạn 2001-2004. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự hợp tác của Trung tâm XLMT, thuộc Bộ Tư lệnh Hóa học và sự công tác của các đồng nghiệp trong và ngoài Viện Công nghệ Sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Armengaud J. et al.**, 1998: J Bacteriol., 180: 3954-3966.
2. **Bunge M. et al.**, 2003: Nature., 421:357-360.
3. **Field A. J.**, 2002: Report prepared for EUROCLO .
4. **Hiraishi A.**, 2003: Microbes Environ, 18: 105-125.
5. **Madigan T. M. et al.** 2000: Brock biology of Microorganism. Prentice Hall International, Inc: 698-702.
6. **Mai Anh Tuấn.**, 2005: Luận văn Thạc sĩ khoa học sinh học. Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
7. **Nông Văn Hải và cs.**, 2003: Hội thảo Khoa học Việt Nam - Hoa Kỳ về các phương pháp xác định, xử lý và đánh giá vùng ô nhiễm dioxin: 64-70. Hà Nội, Việt Nam.
8. **Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà**, 2007: Tạp chí Sinh học, 29(4): 80-85.
9. **Nguyễn Thành Thủy và cs.**, 2004: Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2(3): 381-388.
10. **Parson J. P. et al.**, 1998: Chemosphere, 37: 1915-1922.
11. **Sambrook J., Russell D. W.**, 2001: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
12. **Vargas C. et al.**, 2001: Appl Microbiol Biotechnol 57: 786-790.
13. **Young L. Y., Cerniglia C. E.**, 1995: John Wiley and Sons, Inc., publication: 396-398.

DIOXIN DEGRADATING CAPABILITY AND THE IDENTIFICATION OF GENE ENCODE FOR DIOXIN DIOXYGENASE OF FACULTATIVE ANAEROBIC BACTERIAL MIXTURE SETDN20 FROM TOXIC CHEMICALS CONTAMINATED SOILS IN DANANG

NGUYEN THI SANH, NGHIEM NGOC MINH,
NGUYEN QUOC VIET, DANG THI CAM HA

SUMMARY

The facultative bacterial mixture SETDN20 were isolated from 100 DNT biotreatment in toxic chemical contaminated site of Danang former military base. This bacterial mixture grows well in treated media that added soil extract. This soil extract not only contains 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) but also contain the other chlorinated congeners such as polychlorinated dibenzodioxin (PCDDs), polychlorinated dibenzofuran (PCDFs). The SETDN20 grows well at temperature 30°C in treated media which added soil extract and SETDN20 was able to remove 17.9% total toxicity. The diversity of bacterial mixture SETDN20 was studied base on the observer under TEM and DGGE (Denature gradient gel electrophoresis) techniques and showed that there are three different strains. Results of encoding dioxin dioxygenase gene (with approximately 700 bp in length) and the deduced amino acid sequence analysis and comparison to those in the EMBL databases showed that enzyme was high homology (~99% identity) to some representative of phenylpropionate dioxygenase. The preliminary results obtained indicate that SETDN20 may play certain role in dioxin degradation in facultative anaerobic condition which samely with condition of detoxification treatment by “active land fill” on the spot.

Ngày nhận bài: 18-6-2007