

## XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC TẬP ĐOÀN VI KHUẨN TRONG CÁC CÔNG THỨC XỬ LÝ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN Ở QUI MÔ THỬ NGHIỆM HIỆN TRƯỜNG BẰNG PHÂN HỦY SINH HỌC

NGUYỄN BÁ HỮU, ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

*Viện Công nghệ sinh học*

Khoảng 100 triệu lít chất diệt cỏ chứa dioxin đã được quân đội Mỹ phun rải xuống nhiều vùng ở miền Trung và Nam Việt Nam trong thời gian từ 1961 đến 1971 [13]. Hiện nay, đất và trầm tích ở nhiều vùng trong đó có các căn cứ quân sự cũ tại các sân bay Đà Nẵng, Biên Hòa và Phù Cát vẫn bị ô nhiễm nặng 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin), 2,4,5-T, 2,4-D, dichlorophenol (DCP), trichlorophenol (TCP) và một số hydrocarbon thơm đa nhân. Công nghệ phân hủy sinh học với ưu điểm bởi giá thành thấp và thân thiện với môi trường đang được tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng và thu được các kết quả khả quan [1]. Các nghiên cứu khảo sát vi sinh vật trước đây cho thấy sự biến động rất lớn của các nhóm vi sinh vật trong các công thức xử lý tẩy độc ở qui mô 0,5 m<sup>3</sup> và 1,5 m<sup>3</sup> [1, 8, 9]. Do chỉ một phần nhỏ vi sinh vật có khả năng nuôi cấy được [4] nên cần thêm các nghiên cứu về cấu trúc tập đoàn vi sinh vật trong quá trình xử lý ở các qui mô kể trên. Hiện nay, một số kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên PCR kết hợp điện di trên dải nồng độ chất biến tính (DGGE) đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật [4; 5-7]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR-DGGE đã được sử dụng để đánh giá cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong các công thức xử lý tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin Đà Nẵng ở qui mô thử nghiệm hiện trường. Các kết quả về đa dạng vi sinh vật sẽ giúp các nhà khoa học và công nghệ điều khiển hoạt động của các nhóm vi sinh vật nhằm tăng khả năng chuyển hóa, phân hủy các chất diệt cỏ/dioxin và các chất ô nhiễm khác trong đất nhiễm.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Mẫu đất nhiễm

Mười mẫu đất được lấy từ thí nghiệm khử độc đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin được tiến hành ở qui mô khoảng 0,5 m<sup>3</sup> (5 thùng ký hiệu từ 0,5DN1-4 đến 0,5DN5-5) và 1,5 m<sup>3</sup> (5 thùng ký hiệu từ 1,5DN1-4 đến 1,5DN5-5) [1]. Mẫu trong mỗi thùng được lấy ở 3 điểm cách đều nhau, đất ở mỗi điểm được gạt bỏ lớp bề mặt 0-5 cm sau đó lấy đất ở lớp dưới khoảng 0,5 kg và trộn đều.

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

DNA tổng số của 0,5 g đất được tách chiết và làm sạch bằng FastDNA SPIN kit for soil (Bio101, Inc., Carlsbad, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cặp mồi Com1 (5'- CAG CAG CCG CGG TAA TAC -3) có kẹp GC (CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G) và Com2 (5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3') được dùng để nhân đoạn gen 16S rRNA khoảng 400 bp trong vùng V4 đến V5 [7]. Hỗn hợp 50 µl phản ứng PCR bao gồm nước, 25 µl hỗn hợp PCR 2x (ABgene), 2,5 µl mỗi mồi 10 µM, 2-10 µl DNA tổng số. Chu trình nhiệt giảm dần của phản ứng nhân đoạn gen 16S rRNA của các nhóm vi khuẩn như sau: 95°C - 10 phút ; 13 chu kỳ, mỗi chu kỳ giảm 1°C/chu kỳ ở nhiệt độ gần mỗi (95°C-50 giây, 65°C - 52°C 50 giây, 72°C - 55 giây), 22 chu kỳ (95°C - 50 giây, 52°C - 50 giây, 72°C - 55 giây), 72°C - 7 phút; giữ nhiệt độ ở 15°C sau khi phản ứng kết thúc. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1,6% và quan sát dưới tia UV.

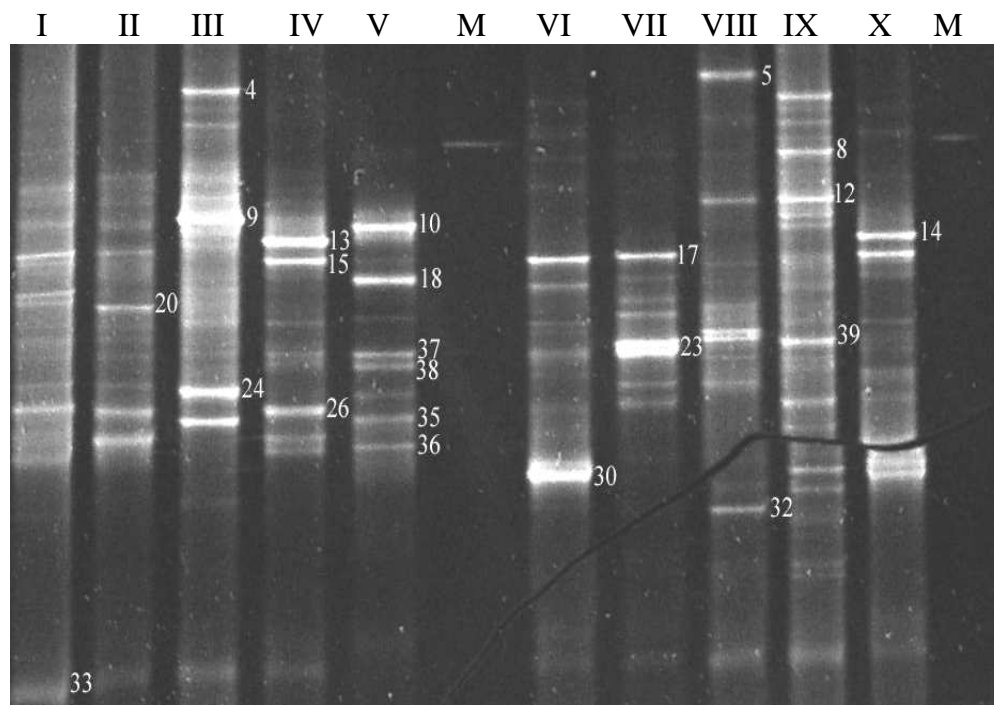
Tiếp theo, 50 µl sản phẩm PCR được tra vào các giếng trên gel DGGE 6% acrylamid, 0,1% bisacrylamid với dải nồng độ chất biến tính 20-

70% urea/formamid [5]. Mẫu ADN được điện di trên gel DGGE, nhuộm và chụp ảnh, ADN thối từ các băng ADN được PCR lại với cặp môi Com1 và Com2, xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rARN và dựng cây phát sinh loài theo như mô tả trước đây [5]. Các trình tự đoạn gen 16S rARN được đăng ký trên GenBank.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

DNA tổng số của 10 mẫu đất được chiết và làm sạch và sử dụng để nhân đoạn gen 16S rRNA. Cặp môi thông dụng Com1 và Com2 đã được Schwieger và Tebbe (1998) sử dụng để nhân để nhân vùng V4 đến V5 gen 16S rRNA sử dụng lần đầu trong kỹ thuật phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn (SSCP) [12]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu về đa dạng vi khuẩn trong môi trường tự nhiên cũng sử dụng cặp môi này. Hơn nữa, một số nghiên cứu trước đây về đa dạng vi khuẩn trong đất nhiễm tại sân bay Đà Nẵng cũng có sử dụng cặp môi Com1, Com2 và kỹ thuật SSCP [7-9]. Do vậy, trong nghiên cứu này cặp môi Com1, Com2 đã được sử dụng để đánh giá và so sánh sự đa dạng vi khuẩn trong đất nhiễm bằng 2 kỹ thuật SSCP và DGGE.

Mục đích của thử nghiệm xử lý khử độc đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin ở các công thức 0,5DN đó là lựa chọn các nguồn nguyên liệu rẻ và có sẵn ở Việt Nam kết hợp với các nguồn dinh dưỡng khác và thay đổi một số yếu tố môi trường trong công thức xử lý, từ đó đưa ra qui trình xử lý hiệu quả [1]. Kết quả ở hình 1 cho thấy, có sự khác biệt về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong 4 công thức xử lý 0,5DN1 đến 0,5DN4. Đa dạng vi khuẩn trong công thức 0,5DN4 thấp hơn so với ở ba công thức xử lý còn lại. Có thể trong công thức này nguồn carbon bổ sung là sản phẩm phụ trong công nghiệp mía đường vẫn còn ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi sinh vật. Hai công thức 0,5DN2 và 0,5DN3 có tỷ lệ cân đối hơn giữa nguồn carbon, ngoài ra mẫu đất ở công thức 0,5DN3 ẩm hơn nên có lẽ đã thúc đẩy sự sinh trưởng của nhiều nhóm vi sinh vật. Công thức không xử lý 0,5DN5 có mức độ đa dạng thấp hơn so với các công thức xử lý, ngoại trừ công thức 0,5DN4. Các kết quả này cũng phù hợp với 3 lần khảo sát trước đây của Nguyễn Bá Hữu và cộng sự về tập đoàn vi khuẩn trong đất ở các công thức khử độc 0,5DN1 đến 0,5DN4 [8].



**Hình 1.** Điện di đồ DGGE đoạn gen mã hóa 16S rARN tập đoàn vi khuẩn trong các công thức tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin. I-0,5DN1-4, II-0,5DN2-4, III-0,5DN3-4, IV-0,5DN4-4, V-0,5DN5-4, VI-1,5DN1-4, VII-1,5DN2-4, VIII-1,5DN3-4, IX-1,5DN4-4, X-1,5DN5-4. Số ghi bên phải các băng ADN là tên của các dòng được xác định trình tự nucleotit

Các công thức xử lý 1,5DN được thử nghiệm với mục đích xác định ở nồng độ chất diệt cỏ/dioxin nào công nghệ phân hủy sinh học vẫn có hiệu quả khử độc [1]. Kết quả ở hình 2 cho thấy mức độ đa dạng khác nhau giữa các công thức xử lý. Các công thức 1,5DN1, 1,5DN3 và 1,5DN4 có độ đa dạng cao hơn so với các công thức xử lý 1,5DN2 và 1,5DN5. Các khảo sát trước đây cho thấy mức độ đa dạng trong công thức xử lý 1,5DN3 và 1,5DN4 có độ đa dạng thấp hơn [9]. Hai mẫu 1,5DN3 và 1,5DN4 có độ

đa dạng cao hơn so với các mẫu còn lại nên có thể đây là nguyên nhân ảnh hưởng đến mức độ đa dạng vi sinh vật ở trong hai công thức này. Hai công thức xử lý này cũng có tổng độ độc ban đầu thấp hơn hai công thức 1,5DN2 và 1,5DN5 [1]. Mẫu 1,5DN5 ở giữa bãi nhiễm độc có hàm lượng dioxin cao nhất lên tới hơn 260.000 pg TEQ/g đất [1]. Trong đợt khảo sát này, hàm lượng các chất diệt cỏ/dioxin có thể vẫn còn cao và có tác động đến cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong mẫu 1,5DN5.

Bảng 1

Mối quan hệ giữa một số dòng đại diện tách từ gel DGGE và các vi khuẩn đã công bố

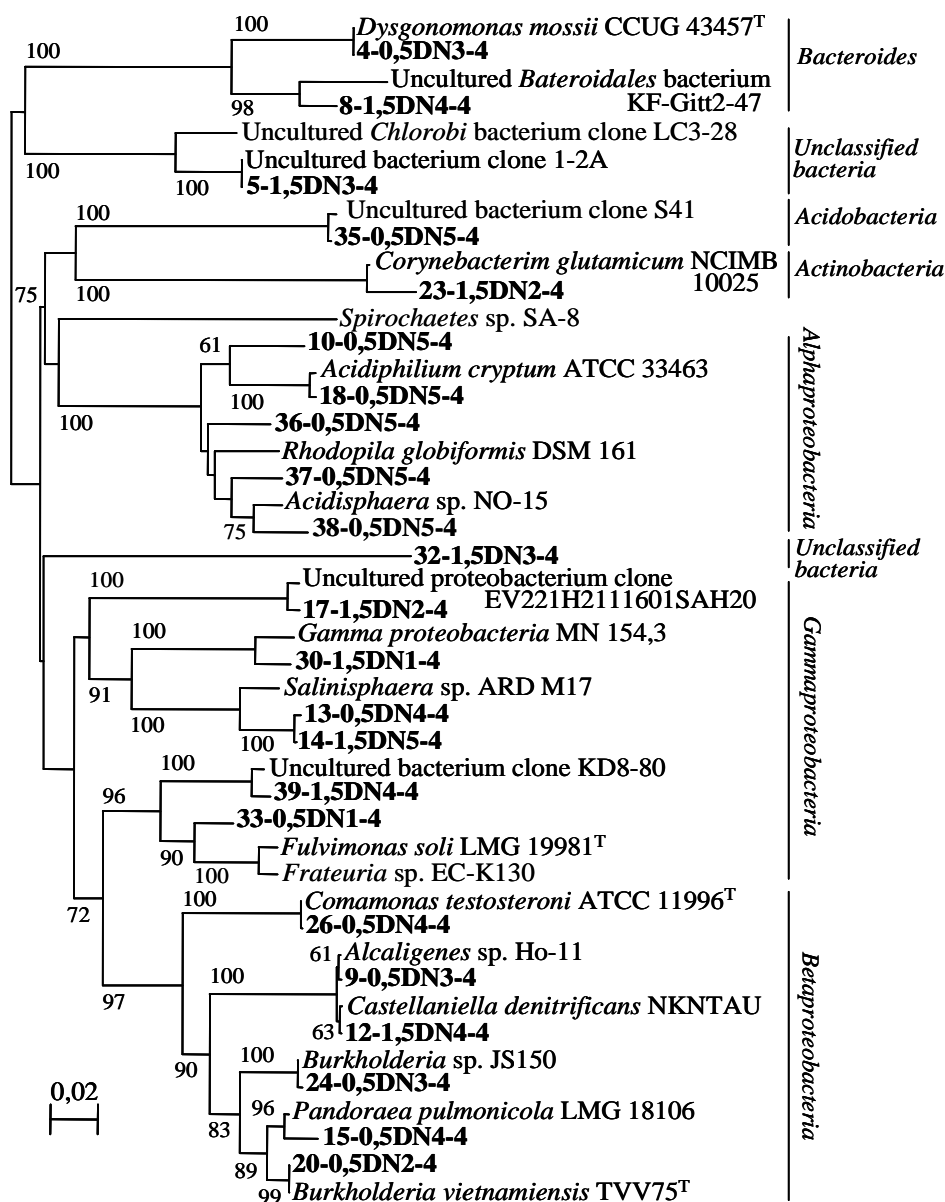
Dòng	Số đăng ký GenBank	Mối quan hệ với các vi khuẩn đại diện		
		Lớp	Vi khuẩn gần gũi nhất	% tương đồng
35-0,5DN5-4	EF490650	<i>Acidobacteria</i>	Uncultured <i>Acidobacterium</i> sp. clone 32HDN9	98,1
23-1,5DN2-4	EF490645	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i> NCIMB 10025 <sup>T</sup>	87,5
4-0,5DN3-4	EF490665	<i>Bacteroides</i>	<i>Dysgonomonas mossii</i> CCUG 43457 <sup>T</sup>	100
8-1,5DN4-4	EF490662		Uncultured <i>Bacteroidales</i> bacterium KF-Gitt2-47	76,1
10-0,5DN5-4	EF490661	$\alpha$ - <i>proteobacteria</i>	Uncultured <i>Acidocella</i> sp. clone 51HDN8	99,4
18-0,5DN5-4	EF490655		<i>Acidiphilium cryptum</i> ATCC 33463 <sup>T</sup>	97,6
36-0,5DN5-4	EF490643		uncultured <i>Rhodospirillales</i> bacterium clone 30-N	85,9
37-0,5DN5-4	EF490649		Uncultured <i>Rhodospirillales</i> eubacterium clone WD248	87,6
38-0,5DN5-4	EF490648		Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> clone RBE1CI-3	83,7
9-0,5DN3-4	EF490663	$\beta$ - <i>proteobacteria</i>	<i>Alcaligenes</i> sp. Ho-11	100
12-1,5DN4-4	EF490660		Uncultured <i>Alcaligenes</i> sp. clone 25-0.5D3-1	100
15-0,5DN4-4	EF490657		Uncultured <i>Burkholderia</i> sp. clone 15-0.5D5-2	92,8
20-0,5DN2-4	EF490641		<i>Burkholderia vietnamiensis</i> TVV75 <sup>T</sup>	99,1
24-0,5DN4-4	EF490654		<i>Burkholderia</i> sp. JS150	98,1
26-0,5DN4-4	EF490653		<i>Comamonas testosteroni</i> ATCC 11966	100
13-0,5DN4-4	EF490659		Uncultured <i>Salinisphaera</i> bacterium clone H263	80,7
14-1,5DN5-4	EF490658	Uncultured <i>Salinisphaera</i> bacterium clone H263	83,9	
17-1,5DN2-4	EF490656	$\omega$ - <i>proteobacteria</i>	Uncultured proteobacterium clone EV221H2111601 SAH20	94,5
30-1,5DN1-4	EF490652		<i>Gamma proteobacterium MN 154.3</i>	80,3
33-0,5DN1-4	EF490644		<i>Fulvimonas soli</i> LMG 19981 <sup>T</sup>	75,5
39-1,5DN4-4	EF490647		Uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> bacterium clone GASP-WA1S2_F08	96,0
5-1,5DN3-4	EF490642		<i>Unclassified bacteria</i>	Uncultured bacterium clone 1-2A
32-1,5DN3-4	EF490651	Unclassified uncultured bacterium; DGGE band RS.Muc.228		57,3

Kết quả xác định trình tự một số băng ADN đậm và đặc trưng trong các công thức xử lý 0,5DN và 1,5DN cho thấy các dòng thuộc 6 lớp vi khuẩn gồm  $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\beta$ -*proteobacteria*,  $\omega$ -*proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*,

*Bacteroides* và vi khuẩn chưa xác định vị trí phân loại. Các khảo sát trước đây sử dụng kỹ thuật “điểm chỉ phân tử” PCR-SSCP đã phát hiện 7 lớp vi khuẩn bao gồm  $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\beta$ -*proteobacteria*,  $\omega$ -*proteobacteria*, *Clostridia*,

*Actinobacteria*, *Bacteroides* và *Bacilli* trong các công thức xử lý 0,5DN [8] và 8 lớp vi khuẩn bao gồm  $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\beta$ -*proteobacteria*,  $\omega$ -*proteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroides*, *Sphingobacteria* và *Bacilli* trong các công thức xử lý 1,5DN [9]. Như vậy, trong đợt khảo sát này vi khuẩn kỵ khí *Clostridium*, *Tissierella*, vi khuẩn kỵ khí tùy tiện *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, vi khuẩn *Escherichia* và *Citrobacter*, vi khuẩn của hai lớp

*Bacilli* và *Sphingobacteria* đã không được phát hiện trong số các băng ADN đem xác định trình tự. Có thể do số lượng băng ADN từ gel DGGE xác định trình tự còn ít và độ ẩm của các mẫu đất hơi khô nên đã ảnh hưởng đến tính đa dạng của một số nhóm vi sinh vật. Do vậy, cần xác định trình tự thêm một số băng ADN trên gel DGGE để có bức tranh rõ nét hơn về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong các công thức xử lý khử độc 0,5DN và 1,5DN.



**Hình 2.** Cây phát sinh loài của một số dòng tách từ gel DGGE các công thức xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng ở qui mô 0,5 m<sup>3</sup>, 1,5 m<sup>3</sup> và các chủng vi khuẩn đại diện trên GenBank. Số Bootstrap lớn hơn 60 được ghi ở các nhánh Thước đo phản ánh sự sai khác của 2 nucleotit trên 100 nucleotit so sánh

Một số băng ADN tách từ gel DGGE mẫu 0,5DN5 (công thức không xử lý) cho thấy cấu trúc tập đoàn vi khuẩn về cơ bản vẫn giống các đợt khảo sát trước sử dụng kỹ thuật SSCP ở công thức này [8] và trong các mẫu đất tại bãi nhiễm [7]. Trong đợt khảo sát này vi khuẩn ưa axit, vi khuẩn khác thuộc lớp *Alphaproteobacteria* và vi khuẩn lớp *Acidobacteria* là các vi khuẩn chiếm ưu thế. Trong đó, các dòng vi khuẩn thuộc chi *Acidiphilium* trội hơn cả. Hiện nay, chưa có nhiều công bố về vi khuẩn thuộc lớp *Acidobacteria* do các vi khuẩn này rất khó nuôi cấy được ở điều kiện phòng thí nghiệm [7].

Trong các công thức xử lý đều thấy sự hiện diện của các dòng vi khuẩn thuộc họ *Burkholderiaceae* trong lớp *Betaproteobacteria*. Nhiều vi khuẩn thuộc lớp này có khả năng sử dụng 2,4-D, 2,4,5-T, dioxin và các hợp chất tương tự [2, 3]. Kết quả trong đợt khảo sát này cũng phù hợp với một số phát hiện của các tác giả khác về đa dạng vi sinh vật trong đất nhiễm chất diệt cỏ [11] và polychlorinated biphenyl (dạng hợp chất có cấu trúc tương tự dioxin) [10]. Dưới tác động chọn lọc tự nhiên, các vi khuẩn sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T phân lập được từ đất nhiễm chất diệt cỏ ở căn cứ quân sự ở Florida (Mỹ) có quan hệ cao với các loài của chi *Burkholderia* [11]. Nghiên cứu của Tiedje và đồng tác giả cho thấy, các chủng vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* chiếm ưu thế trong đất tập đoàn vi khuẩn sử dụng 2,4-D [14].

Các dòng xác định trình tự của các mẫu xử lý 1,5DN ở ba đợt khảo sát trước chưa phát hiện được vi khuẩn *Actinobacteria* [9]. Trong nghiên cứu này đã phát hiện được dòng vi khuẩn 23-1,5DN2-4 có mức tương đồng cao (87,5%) với vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* NCIMB 10025. Trong khảo sát này cũng đã phát hiện dòng vi khuẩn gần gũi với vi khuẩn *Chlorobi*. Vi khuẩn của nhóm này có mặt trong các mẫu đất và trầm tích nhiễm các hợp chất hữu cơ chứa clo [15]. Hơn nữa, vi khuẩn của nhóm này cũng được phát hiện trong các mẫu bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Đà Nẵng [8].

Kết quả phân tích gel DGGE và xác định trình tự một số băng ADN đại diện cho thấy sự khác nhau về cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong các công thức xử lý 0,5DN và 1,5DN. Tuy

hiện, cần có thêm các phân tích hàm lượng các chất diệt cỏ/dioxin trong các mẫu 0,5DN và 1,5DN để có các kết luận chính xác hơn về mối liên hệ giữa nồng độ các chất diệt cỏ/dioxin trong các công thức xử lý và đa dạng vi sinh vật.

### III. KẾT LUẬN

Cấu trúc tập đoàn vi khuẩn có sự khác nhau giữa bốn công thức xử lý từ 0,5DN1 đến 0,5DN4. Đa dạng vi khuẩn trong công thức 0,5DN4 và 0,5DN5 thấp hơn so với ở ba công thức xử lý còn lại.

Các công thức 1,5DN1, 1,5DN3 và 1,5DN4 có độ đa dạng cao hơn so với các công thức xử lý 1,5DN2 và 1,5DN5.

Kết quả xác định trình tự một số băng ADN đậm và đặc trưng trong 5 công thức xử lý 0,5 m<sup>3</sup> và 5 công thức xử lý 1,5 m<sup>3</sup> cho thấy các dòng thuộc 6 lớp vi khuẩn gồm *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroides* và vi khuẩn chưa xác định vị trí phân loại.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện bởi kinh phí của đề tài khoa học cơ bản “Nghiên cứu biến động cấu trúc tập đoàn vi khuẩn hiếu khí trong các công thức xử lý đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng bằng công nghệ phân hủy sinh học” và dự án song phương No.04/13568 giữa chính quyền vùng Walloni, vương quốc Bỉ và Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng T. C. H.** và **cs.**, 2005: Báo cáo nghiên cứu đề tài nhà nước “Nghiên cứu, phát triển công nghệ phân hủy sinh học và kỹ thuật nhả chậm 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.
2. **Hiraishi A.**, 2003: *Microbes Environ.*, 18: 105-123.
3. **Itoh K. et al.**, 2004: *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2110-2118.
4. **Kirk J. L. et al.**, 2004: *J. Microbiol. Methods*, 58: 169-188.
5. **Nguyễn Bá Hữu** và **cs.**, 2006: *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 4: 519-526.

6. **Nguyễn Bá Hữu và cs.**, 2007a: Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 16: 41-45.
7. **Nguyễn Bá Hữu và cs.**, 2007b: Tạp chí Công nghệ sinh học, 5: 123-132.
8. **Nguyễn Bá Hữu và cs.**, 2007c: Tạp chí Công nghệ sinh học, 5: 255-264.
9. **Nguyễn Bá Hữu và cs.**, 2008d: Tạp chí Sinh học, 30: 55-61.
10. **Nogales B. et al.**, 2001: Appl. Environ. Microbiol., 67: 1874-1884.
11. **Rice J. F. et al.**, 2005: Biodegradation, 16: 501-512.
12. **Schwieger F., Tebbe C. C.**, 1998: Appl. Environ. Microbiol., 64: 4870-4876.
13. **Stellman J. M. et al.**, 2003: Nature, 422: 681-687.
14. **Tiedje J. M.**, 1999: Appl. Soil. Ecol., 13: 109-122.
15. **Young-Beom A. et al.**, 2007: FEMS Microbiol. Ecol., 61: 362-371.

## CHARACTERIZATION OF BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE IN BIOREMEDIATION TREATMENT OF HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL AT FIELD TRIALS

NGUYEN BA HUU, DANG THI CAM HA

### SUMMARY

Bioremediation technology has been successfully applied in detoxification at different scales of herbicide/dioxin contaminated soil in the US former military base at Da Nang Airport. PCR-DGGE technique was used for characterization of bacterial community structure in soil samples of biotreatment experiments at small field scales 0.5 m<sup>3</sup> and 1.5 m<sup>3</sup>. There were differences on bacterial diversity level in the soil samples of biotreatments from 0.5DN1 to 0.5DN4. Lower diversity level was found in the soil sample 0.5DN4 and 0.5DN5 in comparison to three others. In other biotreatment scale 1.5 m<sup>3</sup>, the more bacterial diversity was also found in biotreatment experiments 1.5DN1, 1.5DN3 and 1.5DN4 than two other experiments 1.5DN2 and 1.5DN5. The sequence analysis of DNA clones that excised from DGGE gel, showed that these clones were belonged to 6 bacterial classes including *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroides* and also unclassified bacteria. The results obtained from this study provide fundamental bases for enhancement the rate of detoxification of herbicide/dioxin as well as other toxic chemical contaminated soil in Vietnam.

*Ngày nhận bài: 22-4-2009*