ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM
----------///----------

Phạm Ngọc Long

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY 2,4,5-T VÀ ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI CỦA CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ CÁC BIOREACTOR XỬ LÝ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ/DIOXIN

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2009

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên *http://www.lrc-tnu.edu.vn*

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM
----------///----------

Phạm Ngọc Long

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY 2,4,5-T VÀ ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI CỦA CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ CÁC BIOREACTOR XỬ LÝ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ/DIOXIN

Chuyên ngành : **Sinh học thực nghiệm**
Mã số : **60.42.30**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: **TS. Nghiêm Ngọc Minh**

Thái Nguyên - 2009

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – Đại học Thái Nguyên *http://www.lrc-tnu.edu.vn*

Lời cảm ơn

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới ***TS Nghiêm Ngọc Minh****. Trưởng Phòng Công nghệ sinh học Môi trường – Viện Công Nghệ sinh Học đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án.*

Trong quá trình nghiên cứu vừa qua, tôi đã nhận được sự giúp đỡ và chỉ bảo tận tình của ***PGS.TS. Đặng Thị Cẩm Hà*** *và các anh chị Phòng Công nghệ sinh học Môi trường, đặc biệt là* ***Ths. Nguyên Bá Hữu, CN. Nguyễn Văn Bắc, KS. Cung Thị Ngọc Mai****, những người đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án của mình.*

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Khoa sau đại học, khoa Sinh-Kỹ thuật nông nghiệp – Trường đại học Sư phạm – Đại Học Thái Nguyên và lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành khóa luận này.

Bên cạnh đó, tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình và bạn bè đã tạo điều kiện động viên giúp đỡ tôi cả về vật chất và tinh thần để tôi có thể hoàn thành bản luận văn này.

Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 1 tháng 10 năm 2009

Phạm Ngọc Long

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxin
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin
2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid
2,4-D	2,4,- dichlorophenoxyacetic acid
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
LB	Luria - Bertani
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PCDDs	Polychlorinated dibenzo-p-dioxins
PCDFs	Polychlorinated dibenzofurans
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indodyl- β galactosidase

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU **1**

PHẦN 1 TỔNG QUAN **3**

1. Sự ô nhiễm của 2,4,5-T và 2,4-D **3**

2. Đặc điểm và tính chất của 2,4,5-T và 2,4-D **5**

2.1 Chất diệt cỏ 2,4,5-T 5

2.2 Chất diệt cỏ 2,4-D 7

3. Ảnh hưởng của 2,4,5-T, 2,4-D đến môi trường và con người **8**

3.1 Ảnh hưởng của 2,4,5-T và 2,4-D tới môi trường 8

3.2 Ảnh hưởng của 2,4,5-T, 2,4-D đến con người 9

4. Một số phương pháp xử lý chất độc hóa học trong đó có 2,4,5-T và 2,4-D **9**

4.1 Phương pháp xử lý chất độc hóa học bằng hóa học, lý học, cơ học 9

4.2 Phương pháp phân hủy sinh học 10

5. Khả năng phân hủy 2,4,5-T và 2,4-D của một số vi sinh vật **15**

6. Phân loại vi sinh vật **21**

6.1. Phân loại theo phương pháp cổ điển 21

6.2 Phương pháp phân loại bằng sinh học phân tử 22

PHẦN 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP **25**

1. Vật liệu, hóa chất, các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu **25**

1.1 Vật liệu 25

1.2 Hóa chất 25

1.3 Thiết bị, máy móc 25

2. Phương pháp nghiên cứu **26**

2.1 Môi trường nuôi cấy 26

2.1.1 Môi trường SH1 dịch (g/l) 26
2.1.2 Môi trường SH1 thạch 26
2.1.3 Môi trường muối khoáng 26
2.1.4 Môi trường LB dịch 27
2.1.5 Môi trường LB thạch 27
2.1.6 Nước muối sinh lý 27
2.2 Phương pháp nuôi cấy và phân lập vi khuẩn từ mẫu đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin trong bioreactor hiếu khí 27
2.2.1 Nuôi cấy làm giàu vi sinh vật 27
2.2.2 Phương pháp phân lập vi khuẩn 27
2.3 Nghiên cứu hình thái tế bào của chủng vi khuẩn 28
2.3.1 Nhuộm Gram 28
2.3.2 Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét 28
2.4 Phương pháp phân tích khả năng phân hủy 2,4,5-T 29
2.5 Phân loại vi khuẩn dựa trên so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA 29
2.5.1 Phương pháp tách DNA tổng số từ vi sinh vật 29
2.5.2 Nhân đoạn gen 16S rRNA bằng phương pháp PCR 30
2.5.3 Điện di kiểm tra trên gel agarose 31
2.5.4 Tách dòng đoạn gen mã hóa 16S rRNA 31
2.5.5 Biến nạp DNA tái tổ hợp vào tế bào E.coli 31
2.5.6 PCR trực tiếp từ khuẩn lạc (colony–PCR) 32
2.5.7 Tách DNA plasmid theo Kit của hãng Fermentas 33
2.5.8 Xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA 34
2.5.9 Xây dựng cây phát sinh chủng loại 34

PHẦN 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN **35**

1. Nuôi cấy, phân lập chủng vi sinh vật từ mẫu đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin trong bioreactor hiểu khí **35**

1.1 Nuôi cấy, làm giàu tập đoàn vi sinh vật 35

1.2 Phân lập chủng vi khuẩn 37

2. Đặc điểm phân loại của chủng HR5.1 **38**

2.1 Hình thái tế bào 38

2.2 Phân loại dựa trên trình tự gen mã hóa 16S rRNA 39

2.2.1 Tách chiết DNA tổng số 39

2.2.2 Nhân đoạn gen 16S rRNA của chủng HR5.1 bằng kỹ thuật PCR 40

2.2.3 Tách dòng gen 16S rRNA trong vector pBT 41

2.2.4 Xác định trình tự gen 16S rRNA của chủng HR5.1 43

3 Nghiên cứu một số đặc điểm của chủng HR5.1 **47**

3.1 Khả năng phát triển của chủng HR5.1 trên PAH 47

3.2 Khả năng phân hủy 2,4,5-T của chủng HR5.1 49

3.2.1 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy có chứa 2,4,5-T lên sự phát triển của chủng HR5.1 49

3.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ 2,4,5-T lên sự phát triển của chủng HR5.1 50

3.2.3 Khả năng phân hủy 2,4,5-T của chủng vi khuẩn HR5.1 54

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ **56**

TÀI LIỆU THAM KHẢO **57**

MỞ ĐẦU

Trong cuộc chiến tranh xâm lược của Mỹ tiến hành ở Việt Nam, hơn 100 triệu lít chất diệt cỏ chứa 2,4,5-T, 2,4-D và 2,3,7,8 TCDD đã được rải xuống hơn 20% diện tích của miền Nam. Theo công bố của Stellman và cộng sự trên tạp chí Nature năm 2003 thì 20 chất diệt cỏ khác nhau đã được sử dụng. Chu kỳ bán hủy của dioxin và các chất tương tự dioxin rất dài, có khi đến vài chục năm hoặc hàng trăm năm [15],[42]. Qua các điều tra nghiên cứu của nhiều cơ quan khoa học và công nghệ ở Việt Nam và quốc tế cho thấy, đất của sân bay Đà Nẵng và Biên Hòa độ tồn lưu của PCDD, PCDF, 2,4,5-T và 2,4-D vẫn còn cao. 2,4,5-T, 2,4-D có hàm lượng lên tới hàng vài trăm nghìn đến vài triệu µg/kg đất. Ngoài ra một lượng không nhỏ các chất DCP, TCP và PAH cũng đã được xác định trong các mẫu đất tại khu vực bị nhiễm độc. Nghiên cứu áp dụng phương pháp sinh học để khử độc tại "điểm nóng" ở Đà Nẵng thu được kết quả rất khả quan.

Tuy nhiên để xử lý các điểm ô nhiễm cục bộ chất diệt cỏ/dioxin với thời gian ngắn cần có các công nghệ phân hủy sinh học phù hợp. Hiện nay, phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học đang tiến hành xử lý đất ô nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin bằng công nghệ tăng cường sinh học trong các bioreactor hiếu khí và kỵ khí. Trong quá trình xử lý, ngoài sự điều khiển về điều kiện môi trường như độ ẩm, nhiệt độ thì vai trò của các vi sinh vật có trong bioreactor là rất quan trọng. Để tăng hiệu quả và hoàn thiện công nghệ cần tăng thêm hiểu biết về đặc điểm vi sinh vật có trong bioreactor, cũng như vai trò của các vi sinh vật phân hủy chất độc được bổ sung vào bioreactor. Nhằm đáp ứng yêu cầu của thực tiễn đó, đề tài "**Nghiên cứu khả năng phân hủy 2,4,5-T và đặc điểm phân loại của chủng vi khuẩn phân lập từ các bioreactor xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin**" đã được thực hiện.

Luận án đã thực hiện được các nội dung nghiên cứu sau đây

- Làm giầu vi sinh vật từ các mẫu đất trong bioreactor xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin.
- Phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng phát triển trên 2,4,5-T và 2,4-D.
- Nghiên cứu một số đặc điểm của chủng vi khuẩn phân lập được.
- Phân loại định tên chủng vi khuẩn được chọn lựa.
- Xác định khả năng sử dụng 2,4,5-T của chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Luận án này được thực hiện tại phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học và là một phần đề cấp Viện Khoa học và công nghệ Việt Nam: "*Nghiên cứu xử lý tẩy độc một số hợp chất hữu cơ chứa clo bằng các phương pháp hóa học và sinh học tiên tiến*" do PGS.TS. Đặng Thị Cẩm Hà chủ trì.

PHẦN 1 TỔNG QUAN

1. Sự ô nhiễm của 2,4,5-T và 2,4-D

Từ năm 1961 đến năm 1971 quân đội Mỹ đã rải hơn 100 triệu lít chất diệt cỏ xuống nhiều vùng ở miền Trung và Nam Việt Nam [42]. Các chất diệt cỏ đã được sử dụng bao gồm: chất da cam, chất trắng, chất xanh lục, chất xanh lam, chất tím, chất hồng, các chất này được gọi tên theo mầu đánh dấu trên các thùng phuy chứa chúng, mỗi thùng khoảng 250l [42]. Các chất diệt cỏ thường là hỗn hợp của hai chất 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) và 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) với tỷ lệ 50:50 (Bảng 1). Dioxin là tạp chất được sinh ra trong quá trình sản xuất 2,4,5-T. Hàm lượng dioxin trong các chất diệt cỏ rất khác nhau, ước tính số lượng dioxin chứa trong chất diệt cỏ mà Mỹ đã dùng trong chiến tranh Việt Nam từ 170 - 1000 kg [42], [15].

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của các chất diệt cỏ quân đội Mỹ đã sử dụng trong chiến tranh Việt Nam [42].

Tên chất	Thành phần hoá chất	Độ đậm đặc tương đương	Sử dụng trong trong năm	Số lượng ước tính đã rải (lít)
Chất hồng	60% - 40% n-Butyl: isobutylester của 2,4,5-T	961-1081 g/l acid tương đương	1961-1965	503.121; 413,852
Chất xanh lá cây	n-Butylester của 2,4,5-T	Giống như chất hồng	Chưa rõ, rải cùng thời gian với chất hồng	31.026
Chất tím	50%n-Butylester 2,4,D 30% Butylester	1033 g/l acid tương đương	1962-1965	1.892.773