

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH TÊN CHỦNG VI KHUẨN HR5.1 TỪ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ/DIOXIN XỬ LÝ BẰNG BIOREACTOR HIẾU KHÍ

Phạm Ngọc Long¹, Nguyễn Văn Bắc¹, Đặng Thị Cẩm Hà¹, Nghiêm Ngọc Minh^{1*}

¹ Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn HR5.1 được phân lập từ bioreactor xử lý đất nhiễm chất độc hóa học ở sân bay Đà Nẵng. Chủng HR5.1 thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, khuẩn lạc tròn, có màu trắng đục, đường kính từ 1,9-2,1mm. Tế bào chủng HR5.1 có hình que ngắn với chiều dài là 1,6-1,9 µm và chiều rộng là 0,5-0,6 µm. Dựa trên một số đặc điểm hình thái và trình tự nucleotide của gen mã hóa 16S rRNA đầy đủ, vi khuẩn HR5.1 có độ tương đồng cao so với các chủng thuộc chi *Pseudomonas* và nó được đặt tên là *Pseudomonas* sp HR5.1.

Từ khóa: *Pseudomonas*, 2,4,5-T, Bioreactor, chất diệt cỏ/dioxin, 16S rRNA.

1. MỞ ĐẦU

Trước đây trên thế giới cũng như ở Việt Nam, việc phân loại vi sinh vật chủ yếu vẫn dựa vào đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy, sinh lý, hóa sinh... Việc phân loại này có nhiều ưu điểm song cũng có những nhược điểm nhất định. Chẳng hạn một chủng vi sinh vật nào đó về mặt hình thái rất gần với chi này nhưng khi phân tích ở mức độ phân tử thì lại thuộc chi khác. Cùng với sự phát triển của sinh học phân tử và công nghệ gen, phương pháp phân loại học phân tử đã ra đời chủ yếu dựa trên các kỹ thuật phân tích DNA. Phương pháp thường được sử dụng trong nghiên cứu phân loại và đa dạng vi sinh vật là dùng các kỹ thuật phân tử như phân tích trình tự gen 16S rRNA, kỹ thuật điện di trên gel biến tính nồng độ (DGGE), điện di trên gel biến tính nhiệt độ (TGGE)... Việc định tên các loài vi sinh vật dựa trên cấu trúc gen 16S rRNA có nhiều thuận lợi, đặc biệt là rút ngắn thời gian nghiên cứu. Tại phòng Công nghệ sinh học môi trường thuộc Viện Công nghệ sinh học, phương pháp phân loại vi

sinh vật dựa trên việc so sánh trình tự nucleotide của gen mã hóa 16S rRNA đã được áp dụng và thu được nhiều kết quả có giá trị [2,3]. Nhằm cung cấp thêm thông tin về vi sinh vật có mặt trong bioreactor hiếu khí xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin, tập đoàn vi sinh vật và một số chủng sinh vật đã được nghiên cứu. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả phân lập và phân loại dựa trên một số đặc điểm hình thái và trình tự gen mã hóa 16S rRNA đầy đủ của chủng vi khuẩn HR5.1 phân lập từ bioreactor hiếu khí xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin ở qui mô pilot mà đất ô nhiễm đã lấy từ khu vực nhiễm độc của sân bay Đà Nẵng.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn, được ký hiệu là HR5.1 được phân lập từ đất trong bioreactor hiếu khí đang xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin ở qui mô pilot 150/kg. Đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin được thu ở sân bay Đà Nẵng, đây là một trong các nội dung của đề tài cấp viện KH&CN 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

*Nghiêm Ngọc Minh, Tel: 0988886930;

Email: nghiemminh@ibt.ac.vn

tiến” do Đặng Thị Cẩm Hà và cộng sự thực hiện.

Môi trường SH1/5 có chứa 200ppm 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) được sử dụng cho các nghiên cứu trong công trình này.

Sử dụng mỗi xuôi 27F: 5' AGA GTT TGA TTC MTG GCT CAG 3' và mỗi ngược 1492R: 5' GGY TAC CTT GTT ACG ACTT 3' để phân loại phân tử chủng HR5.1.

2.2. Phương pháp

Phân lập

Vi khuẩn được phân lập theo phương pháp làm giàu nhiều. Cân 5g đất từ bioreactor đang xử lý cho vào bình tam giác 250ml chứa 50ml môi trường SH1/5 có bổ sung 200ppm 2,4,5-T, nuôi lắc 3-5 ngày ở 30°C. Chuyển 10% giống ở lần làm giàu thứ nhất sang bình làm giàu lần hai và lần thứ ba. Sau lần làm giàu thứ ba lấy 0,5ml dịch nuôi cấy pha loãng và gọt trên môi trường SH1/5 thạch có bổ sung 2,4,5-T. Nuôi ở 30°C trong 3-5 ngày, các khuẩn lạc mọc riêng rẽ sẽ được tách ra nuôi trên môi trường dịch SH1/5. Kiểm tra độ sạch của chủng vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học.

Quan sát hình thái tế bào

Hình thái tế bào chủng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét JSMLV 5410 với sự hợp tác của Viện 69, Bộ Tư Lệnh Lãng.

Phân loại vi khuẩn dựa vào gen mã hóa 16S rRNA

Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Sambrook và Russell 2001 [7]. DNA được tinh sạch và tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1492R.

Điều kiện của phản ứng PCR được tiến hành như sau: hỗn hợp PCR với tổng thể tích là 25µl gồm: 1 µl mồi mỗi loại, 2,5 µl hỗn hợp dNTPs, 2,5 µl đệm PCR, 3 µl MgCl₂, 0,2 µl taq polymerase, 1 µl DNA tổng số của vi khuẩn. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR 9700 với chu trình

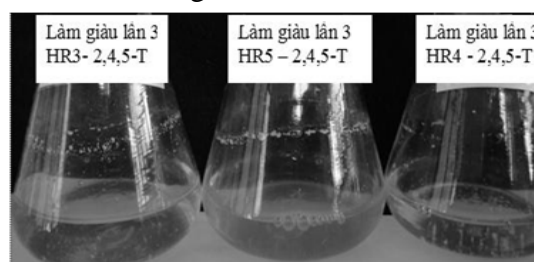
như sau: bước 1: 95°C trong 5 phút, bước 2: 94°C trong 1 phút, bước 3: 55°C trong 1 phút, bước 4: 72°C trong 1 phút 30 giây, bước 5: lặp lại 30 lần từ bước 2 đến bước 4, bước 6: 72°C trong 8 phút, bước 7: 4°C để qua đêm.

Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose nồng độ 1%, nhuộm gel bằng ethium bromide và được quan sát dưới ánh đèn tử ngoại. Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vector pBT nhờ enzyme T4-DNA ligase, sản phẩm được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α và chọn lọc trên môi trường LB đặc có chứa 50mg/l ampicillin, 80mg/l X-gal, nuôi ở 37°C qua đêm. Tách chiết và làm sạch DNA plasmid theo Kit Plasmid DNA purification. Xác định trình tự nucleotide của gen trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Data Analyzer. So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn HR5.1 với các trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA tương ứng tại ngân hàng gen quốc tế EMBL.

3. KẾT QUẢ VÀO THẢO LUẬN

3.1. Phân lập chủng HR5.1 từ bioreactor xử lý đất nhiễm chất độc hóa học

Từ nguồn đất trong ba bioreactor xử lý đất nhiễm chất độc hóa học, được ký hiệu là HR3, HR4, HR5. Chúng tôi tiến hành làm giàu thu nhận được ba tập đoàn vi sinh vật có khả năng phát triển trên môi trường SH1/5 có bổ sung 2,4,5-T. Chúng tôi nhận thấy tập đoàn vi sinh vật ở reactor HR5 phát triển mạnh nhất trong ba tập đoàn được làm giàu do đó chúng tôi chọn tập đoàn HR5 để tiến hành phân lập chủng vi khuẩn phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo. Chúng tôi đã chọn lọc và phân lập chủng HR5.1 là chủng phát triển tốt trên môi trường có 2,4,5-T.



Hình 1. Khả năng phát triển của tập đoàn vi sinh vật HR3, HR4, HR5 trên môi trường SH1/5 có bổ sung 2,4,5-T.

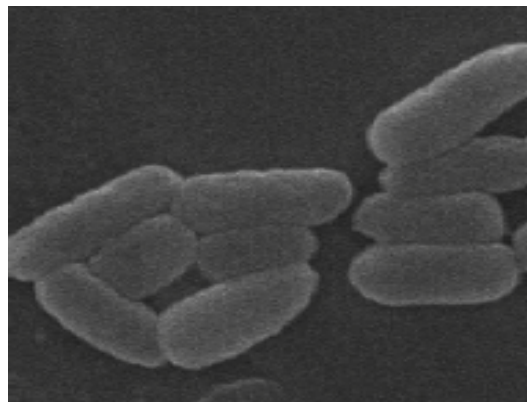
3.2. Đặc điểm hình thái và tế bào của chủng vi khuẩn HR5.1

Chủng HR5.1 là vi khuẩn Gram âm, khuẩn lạc tròn, có màu trắng đục, đường kính từ 1,9-2,1mm (hình 2A). Hình dạng tế bào của chủng HR5.1 đã được quan sát bằng kính hiển vi điện từ quét với độ



A

phóng đại 10000 lần. Tế bào có dạng hình que ngắn kích thước khoảng (1,6-1,9)x(0,5-0,6) μm (hình 2B). Quan sát hình thái của khuẩn lạc và hình thái tế bào cho thấy chủng HR5.1 có nhiều đặc điểm khá giống với các loài thuộc chi *Pseudomonas*. Để khẳng định rõ hơn chủng vi khuẩn HR5.1 có thuộc chi *Pseudomonas* hay không và vị trí phân loại của chủng này, chúng tôi đã tiến hành phân loại phân tử chủng vi khuẩn HR5.1 dựa vào xác định trình tự nucleotide của gen mã hóa 16S rRNA đầy đủ.

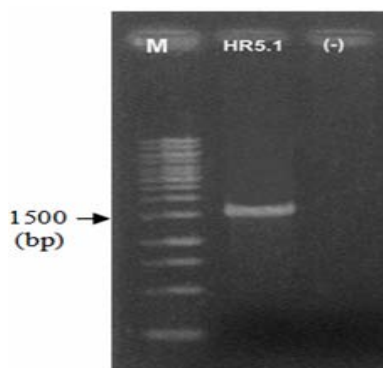


B

Hình 2. Hình dạng của khuẩn lạc (A), hình thái của tế bào chủng HR5.1(B)

3. Phân loại bằng xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA

Sử dụng DNA tổng số tách từ chủng HR5.1 để làm khuôn, cặp mồi đặc hiệu (27F và 1492R) và chu trình nhiệt như đã trình bày ở phần phương pháp để nhân gen 16S rRNA. Về mặt lý thuyết gen mã hóa 16S rRNA khoảng 1500bp của chủng này sẽ được nhân lên. Sau phản ứng, sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agaroz 1% kết quả được thể hiện trên hình 3.

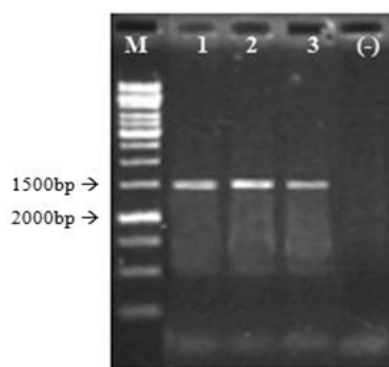


Hình 3. Phổ điện di sản phẩm PCR của chủng HR5.1

- Giếng M Thang DNA chuẩn 1Kb
- Giếng HR5.1 Sản phẩm PCR của chủng HR5.1

Trên điện di đồ chúng ta có thể thấy sản phẩm PCR là một băng duy nhất và có kích thước khoảng 1500bp, đúng với kích thước theo tính toán lý thuyết. Điều này chứng tỏ phản ứng PCR đã nhân khá đặc hiệu đoạn gen 16S rRNA có kích thước mong muốn.

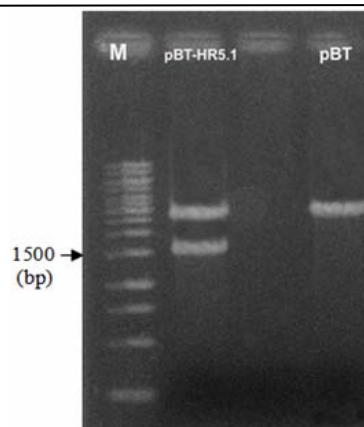
Sản phẩm PCR đã được tiến hành gắn vào vector pBT nhờ enzyme T4 DNA ligase và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli*. sau khi nuôi qua đêm ở 37°C, trên đĩa biến nạp xuất hiện các khuẩn lạc xanh và trắng xen kẽ nhau. Chọn một số khuẩn lạc trắng để làm khuôn cho phản ứng colony-PCR với chu trình nhiệt và thành phần phản ứng như ở phần phương pháp. Kết quả phản ứng colony-PCR được thể hiện trên hình 4. Sản phẩm PCR của ba khuẩn lạc được chọn để PCR kiểm tra là một đoạn gen có kích thước khoảng 1500bp phù hợp với kích thước của sản phẩm PCR gen 16S rRNA (hình 4).



Hình 4. Phổ điện di sản phẩm colony-PCR

- Giếng M Thang DNA chuẩn 1Kb
- Giếng 1,2,3 Thứ tự các dòng được chọn để tiến hành colony-PCR

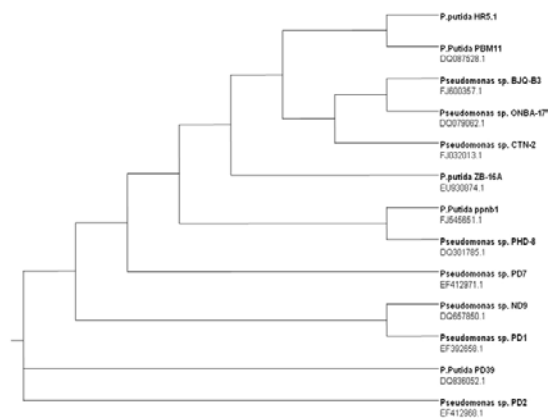
Điều này chứng tỏ cả ba khuẩn lạc được chọn đều có DNA plasmid mang 16S rRNA. Một dòng đã được chọn để tách DNA plasmid bằng Kit Plasmid DNA purification. Sau khi tách DNA plasmid, enzyme *Bam*HI đã được sử dụng để cắt dòng DNA plasmid này. Kết quả điện di sản phẩm cắt cho thấy có một đoạn gen có kích thước khoảng 1500bp đã được cắt (hình 5). Kích thước đoạn gen này phù hợp với kích thước gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn nghiên cứu.



Hình 5. Điện di đồ sản phẩm cắt DNA plasmid bằng enzyme *Bam*HI

- Giếng M: Thang DNA chuẩn 1kb
- Giếng pBT-HR5.1: dòng Plasmid được chọn
- Giếng pBT: dòng plasmid đối chứng

Sản phẩm tách DNA plasmid đã được sử dụng để xác định trình tự nucleotide. Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA được xác định bằng phương pháp của Sanger. Trình tự gen đầy đủ của gen 16S rRNA của chủng HR5.1 được xử lý và tiến hành xây dựng cây phát sinh chủng loài.



Hình 6. Cây phát sinh chủng loài của chủng *Pseudomonas* sp.HR5.1.

Trên cây phát sinh chủng loại (hình 6), chủng HR5.1 có quan hệ gần gũi với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* như *Pseudomonas putida* PBM11, *Pseudomonas* sp. BJQ-B3, *Pseudomonas* sp.ONBA-17. Dựa trên một số đặc điểm hình thái và trình tự của gen 16S rRNA đầy đủ của chủng HR5.1, vi khuẩn này có

thể được xếp vào chi *Pseudomonas* và tạm đặt tên là *Pseudomonas* sp.HR5.1.

Một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy một số loài vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* cũng có khả năng phân hủy 2,4,5-T và các hợp chất thơm chứa clo. Các vi sinh vật gần gũi với chủng vi khuẩn HR5.1 cũng được chứng minh có khả năng phân hủy các hợp chất thơm chứa clo như *Pseudomonas putida* PBM11 mà từ dữ liệu của Genbank đã cho biết nó phân hủy 3-phenoxybenzoic acid. Theo Fang-Bo và cộng sự thì chủng *Pseudomonas* sp.ONBA-17 có khả năng phân hủy 100mg/l *o*-nitrobenzaldehyde trong 48 h [5]. Theo nghiên cứu của Karns và cộng sự thì *Pseudomonas cepacia* AC1100 có khả năng phân hủy tới 1500 ppm 2,4,5-T [6]. Chủng *Pseudomonas pseudoalcaligenes* NRRL B-18087 được Roy phân lập đã phân hủy 2,4,5-T, 2,4-D và hai chất diệt cỏ này chính là nguồn carbon và năng lượng duy nhất cho sự sinh trưởng và phát triển [4]. La Thị Thanh Phương và cộng sự [1] đã phân lập chủng *Pseudomonas* sp.BDN15 cũng từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Đà Nẵng và chủng này sau 90 ngày ở điều kiện nuôi tĩnh và nhiệt độ phòng đã phân hủy 39,37% 2,4,5-T với nồng độ ban đầu là 1000ppm. Chất diệt cỏ 2,4,5-T cũng là nguồn năng lượng và carbon duy nhất trong môi trường nuôi cấy chủng BDN15. Các nghiên cứu về khả năng phân hủy 2,4,5-T và các chất ô nhiễm đa vòng thơm khác của chủng HR5-1 đang được tiến hành.

4. KẾT LUẬN

Chủng HR5.1 thuộc vi khuẩn Gram âm, khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục, đường kính từ 1,9-2,1 mm. Dưới kính hiển vi điện tử quét tế bào của chủng HR5.1 có dạng que ngắn kích thước 1,6-1,9 x 0,5-0,6µm. Trình tự gen mã hóa 16S rRNA đầy đủ có độ tương đồng cao với một số loài thuộc chi *Pseudomonas* và vi khuẩn này được đặt tên là *Pseudomonas* sp.HR5.1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1].La Thị Thanh Phương, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2005). *Một số đặc điểm sinh học và khả năng phân sử dụng 2,4,5-T của chủng vi khuẩn BDN15 phân lập từ vùng đất ô nhiễm chất độc hóa học*. Tạp Chí Công nghệ Sinh học 3(3): 389-396.
- [2].Nghiêm Ngọc Minh, Cung Thị Ngọc Mai, Đặng Thị Cẩm Hà (2007). *Phân loại chủng vi khuẩn BNA5 được phân lập từ đất bị nhiễm DDT bằng phương pháp phân tích trình tự nucleotit của gen 16S rRNA*. Tạp chí Sinh học 1(3): 76-81.
- [3].Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Đương Nhã, Đặng Thị Cẩm Hà (2004). *Phân loại chủng vi sinh vật XKDN13 từ đất bị nhiễm chất độc hóa học*. Tạp chí Sinh học 2(1): 125-132.
- [4].Dipak Roy, Baton Rouge (1989) *Detoxification of chlorinated aromatic compounds by organism NRRL B-18087*. United States Patent 4804629.
- [5].Fang-Bo, Yu; Biao, Shen; Shun-Peng, Li (2006). *Isolation and Characterization of Pseudomonas sp. Strain ONBA-17 Degrading o-Nitrobenzaldehyde*. Current Microbiology, Volume 53, Number 6, pp. 457-461.
- [6].Karns SJ, Kilbane JJ, Duttagupta S, Chakrabarty MA (1983) *Metabolism of halophenols by 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid-degrading Pseudomonas Cepacia*. Appl Environ Microbiol: 1176-1181.
- [7].Sambrook J. and Ruslee D.W (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Pree, Cold Spring Harbor,NY.

SUMMARY

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL STRAIN HR5.1 FROM BIOTREATMENT OF HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL BY AEROBIC BIOREACTOR

Phạm Ngọc Long¹, Nguyễn Văn Bắc¹, Đặng Thị Cam Hà¹, Nguyễn Ngọc Minh^{1*}

Institute of Biotechnology

The bacteria strain HR5.1 was isolated from bioreactor that used to detoxin of herbicide contaminated soil. Strain HR5.1 belong to negative gram bacteria, colonies HR5.1 are round and smooth colony with 1,9-2,1 diameter. The cellular morphology of strain HR5.1 was observed under the Scanning Electronic Microscopy (SEM) showed that it was a short rod and 1,6-1,9 μm x 0,27-0,53 μm size.

Characterization of HR5.1 based on analysis of 16S rRNA gene sequence was carried out and showed that this strain high similar to other strain of *Pseudomonas* genus. Based on results of morphology characteristics and 16S rRNA genes sequence, that HR5.1 should be placed in genus *Pseudomonas* and named *Pseudomonas* sp HR5.1.

Key Words: *Pseudomonas*, 2,4,5-T, herbicide/dioxin, bioreactor, 16S rRNA.

* Nguyễn Ngọc Minh, Tel: 0988886930,
Email: nghieminh@ibt.ac.vn