

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN THỊ TÂM THƯ

**NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG QUẦN XÃ VI
KHUẨN KỶ KHÍ TRONG CÁC LÔ XỬ LÝ CHẤT
DIỆT CỎ/DIOXIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP
PHÂN HỦY SINH HỌC**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI, 2013

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Nguyễn Thị Tâm Thư

**NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG QUẦN XÃ VI KHUẨN
KỶ KHÍ TRONG CÁC LÔ XỬ LÝ CHẤT DIỆT
DIỆT CỎ/DIOXIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN
HỦY SINH HỌC**

Chuyên ngành: Vi sinh vật

Mã số: 62 42 01 07

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: **1. PGS.TS. Đặng Thị Cẩm Hà**

Viện Công nghệ sinh học

2. TS. Đinh Thị Thu Hằng

Viện Công nghệ sinh học

Hà Nội, 2013

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS. TS. Đặng Thị Cẩm Hà và TS. Đinh Thị Thu Hằng, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, là những người thầy đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện về cơ sở vật chất giúp tôi thực hiện và hoàn thành đề tài luận án nhạy cảm và thuộc loại khó này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học đã tạo mọi điều kiện cho tôi được học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án tại Phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, Phòng thí nghiệm trọng điểm, Phòng Kỹ thuật di truyền.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới Đại tá Phan Nguyễn Khánh, Đại tá Tô Văn Thiệp – Thủ trưởng Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự đã cho phép và tạo điều kiện cho tôi được thực hiện nguyện vọng của mình và hoàn thành luận án đúng thời hạn.

Tôi xin chân thành cảm ơn ThS. Đào Thị Ngọc Ánh, CN Lê Việt Hưng, NCS. Phùng Khắc Huy Chú và các đồng nghiệp khác tại phòng Công nghệ Sinh học tái tạo môi trường đã giúp đỡ và chia sẻ, bàn luận kết quả thu được với tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn ThS. Bùi Thị Hải Hà - Chuyên viên phụ trách đào tạo, Viện Công nghệ sinh học, đã hướng dẫn tôi tận tình để hoàn thành mọi thủ tục trong quá trình làm nghiên cứu sinh.

Tôi xin chân thành cảm ơn các đồng chí, cán bộ Phòng Công nghệ Sinh học, Phòng Công nghệ Hóa sinh và các cán bộ Viện Công nghệ mới đã luôn động viên, khích lệ, giúp đỡ tôi hoàn thành nhiệm vụ trong thời gian tôi không có mặt ở đơn vị.

Tôi xin bày tỏ sự biết ơn sâu sắc đến chồng tôi cùng hai bên gia đình đã động viên, chia sẻ trách nhiệm chăm lo gia đình, con cái để tôi có thêm thời gian thực hiện tốt nghiên cứu này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2013

Nguyễn Thị Tâm Thư

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các cộng sự khác.

Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự cho phép và đồng ý của các đồng tác giả. Phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội ngày tháng năm 2013

Tác giả

Nguyễn Thị Tâm Thư

MỤC LỤC

	Trang
Trang phụ bìa	
Lời cảm ơn	i
Lời cam đoan	ii
Mục lục	iii
Danh mục các thuật ngữ và ký hiệu viết tắt	viii
Danh mục các bảng	x
Danh mục các hình vẽ, đồ thị	xi
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	5
1.1. Đặc điểm của các hợp chất hữu cơ chứa clo	5
1.1.1. Một số đặc điểm chung của các hợp chất hữu cơ chứa clo	5
1.1.2. Ảnh hưởng của các hợp chất hữu cơ chứa clo tới con người và môi trường	7
1.2. Tình hình ô nhiễm các hợp chất hữu cơ chứa clo	8
1.2.1. Tình hình ô nhiễm các hợp chất hữu cơ chứa clo trên thế giới	8
1.2.2. Tình hình ô nhiễm các hợp chất hữu cơ chứa clo ở Việt Nam	9
1.2.2.1. Ô nhiễm các hợp chất hữu cơ nói chung	9
1.2.2.2. Ô nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở sân bay Biên Hòa	10
1.2.2.3. Ô nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở sân bay Đà Nẵng	11
1.2.2.4. Ô nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở sân bay Phù Cát	11
1.3. Phân hủy sinh học các hợp chất hữu cơ chứa clo	12
1.3.1. Cơ chế phân hủy và chuyển hóa các hợp chất hữu cơ chứa clo	12
1.3.2. Phân hủy hiếu khí chất diệt cỏ/dioxin	17
1.3.2.1. Phân hủy hiếu khí các chất diệt cỏ chlorophenoxy	17
1.3.2.2. Phân hủy hiếu khí các hợp chất dioxin	18
1.3.3. Phân hủy kỵ khí chất diệt cỏ/dioxin	20
1.3.3.1. Phân hủy sinh học kỵ khí các chất diệt cỏ chlorophenoxy	20
1.3.3.2. Phân hủy kỵ khí các hợp chất dioxin	21

1.4.	Đa dạng các vi khuẩn tham gia hô hấp loại khử clo	21
1.4.1.	Đặc điểm chung của các vi khuẩn hô hấp loại khử clo	21
1.4.2.	Đa dạng vi khuẩn khử sulfate	25
1.4.3.	Đa dạng vi khuẩn <i>Dehalococcoides</i>	28
1.4.4.	Đa dạng vi khuẩn <i>Pseudomonas</i>	30
1.5.	Đa dạng các gene chức năng tham gia vào quá trình loại khử clo	32
1.6.	Các phương pháp nghiên cứu đa dạng vi sinh vật	36
1.6.1.	Phương pháp vi sinh vật	36
1.6.2.	Phương pháp hóa sinh	37
1.6.3.	Phương pháp sinh học phân tử	37
1.6.4.	Phương pháp Metagenomics	38
1.7.	Các phương pháp làm sạch nguồn ô nhiễm dioxin và các hợp chất tương tự bằng phân hủy sinh học	42
1.8.	Nghiên cứu về phân hủy sinh học chất diệt cỏ chứa dioxin ở Việt Nam	45
1.8.1.	Phân hủy sinh học ở lô xử lý tại sân bay Đà Nẵng	46
1.8.2.	Phân hủy sinh học ở lô xử lý tại sân bay Biên Hòa	48
1.8.3.	Các nghiên cứu về vi khuẩn chuyển hóa và loại khử clo ở Việt Nam	49
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU		52
2.1.	Vật liệu	52
2.1.1.	Mẫu đất từ lô xử lý ở sân bay Đà Nẵng	52
2.1.2.	Mẫu đất từ lô xử lý ở sân bay Biên Hòa	52
2.1.3.	Trình tự nucleotide của các cặp môi đã sử dụng	53
2.1.4.	Các hóa chất và thiết bị máy móc	54
2.1.5.	Thành phần các môi trường nuôi cấy và dung dịch đã sử dụng	55
2.1.5.1.	Thành phần môi trường nuôi cấy	55
2.1.5.2.	Các dung dịch đã sử dụng	56
2.2.	Phương pháp	56
2.2.1.	Chiết các thành phần của chất diệt cỏ/dioxin từ đất	56
2.2.2.	Tách DNA tổng số	57

2.2.3. Đánh giá sự đa dạng vi khuẩn kỵ khí từ các lô xử lý	57
2.2.3.1. Nested-PCR	57
2.2.3.2. DGGE	58
2.2.4. Xác định trình tự nucleotide và xây dựng cây phát sinh chủng loại	59
2.2.5. Đánh giá sự biến động các vi khuẩn kỵ khí trong lô xử lý chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa	59
2.2.6. Làm giàu vi khuẩn kỵ khí	59
2.2.6.1. Làm giàu vi khuẩn khử sulfate	59
2.2.6.2. Làm giàu vi khuẩn kỵ khí hô hấp loại clo	60
2.2.7. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên sự sinh trưởng của quần xã vi khuẩn khử sulfate	61
2.2.8. Làm sạch vi khuẩn khử sulfate	61
2.2.9. Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn	62
2.2.10. Tách dòng đoạn gene mã hóa 16S rRNA	62
2.2.11. Đánh giá khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ chứa clo (đa) vòng thơm	62
2.2.11.1. Đánh giá khả năng phân hủy các chất là thành phần của chất diệt cỏ	62
2.2.11.2. Đánh giá khả năng phân hủy các đồng phân dioxin trong mẫu làm giàu	63
2.2.11.3. Xác định 2,4-DCP và 2,4,5-T	64
2.2.12. Đánh giá sự đa dạng vi khuẩn kỵ khí và gene chức năng trong mẫu làm giàu	65
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	67
3.1. Đa dạng vi khuẩn loại khử clo trong các lô xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin	68
3.1.1. Đa dạng vi khuẩn hô hấp loại khử clo nói chung trong các lô xử lý	68
3.1.2. Đa dạng vi khuẩn khử sulfate trong các lô xử lý	69
3.1.3. Đa dạng vi khuẩn <i>Dehalococcoides</i> trong các lô xử lý	72
3.2. Sự đa dạng vi khuẩn và các gene chức năng trong mẫu làm giàu	74
3.2.1. Làm giàu vi khuẩn kỵ khí hô hấp loại clo trên đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin	74
3.2.2. Sự đa dạng vi khuẩn trong mẫu làm giàu	75
3.3. Sự biến động số lượng vi khuẩn kỵ khí trong lô xử lý tại Biên Hòa	80

3.3.1. Sự biến động số lượng vi khuẩn khử sulfate trong lô xử lý	80
3.3.2. Sự biến động số lượng vi khuẩn kỵ khí sử dụng chất diệt cỏ/dioxin tại lô xử lý	81
3.4. Sự đa dạng một số nhóm gene chức năng tham gia vào các quá trình của tế bào	81
3.4.1. Sự có mặt của các gene reductive dehalogenase (<i>rdhA</i>) trong các lô xử lý và trong mẫu làm giàu	81
3.4.2. Sự đa dạng một số nhóm gene chức năng tham gia vào các quá trình của tế bào phát hiện bằng Metagenomics	82
3.4.3. So sánh trình tự một số gene chức năng mã hóa cho enzyme tham gia vào quá trình phân hủy các hợp chất vòng thơm	84
3.5. Một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn khử sulfate	87
3.5.1. Làm giàu quần xã vi khuẩn khử sulfate	87
3.5.2. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sinh trưởng của quần xã vi khuẩn khử sulfate	87
3.5.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ	88
3.5.2.2. Ảnh hưởng của pH	88
3.5.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl	89
3.5.2.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon	90
3.5.2.5. Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết đất	91
3.5.2.6. Ảnh hưởng của một số hợp chất chứa clo hữu cơ	91
3.5.3. Phân lập, phân loại vi khuẩn khử sulfate	92
3.5.3.1. Quan sát hình thái tế bào	93
3.5.3.2. Trình tự đoạn gene 16S rRNA đặc hiệu cho vi khuẩn khử sulfate	93
3.6. Sự có mặt của <i>Dehalococcoides</i> trong mẫu làm giàu	94
3.6.1. Làm giàu vi khuẩn kỵ khí loại khử clo trên nguồn DCD, 2,4,5-T, 2,4-DCP	95
3.6.2. Hình thái một số tế bào vi khuẩn trong mẫu làm giàu trên các chất ô nhiễm	96
3.6.3. Nhân đoạn gene 16S rRNA đặc hiệu của vi khuẩn <i>Dehalococcoides</i>	97
3.6.4. Trình tự đoạn gene 16S rRNA của <i>Dehalococcoides</i> trong mẫu làm giàu	97
3.7. Khả năng phân hủy hay chuyển hóa các thành phần của chất diệt cỏ/dioxin	99
3.7.1. Khả năng phân hủy và chuyển hóa PCDD/Fs trong mẫu làm giàu	99

3.7.2. Khả năng phân hủy và chuyển hóa 2,4-DCP, 2,4,5-T	102
3.7.2.1. Khả năng chuyển hóa 2,4,5-T	102
3.7.2.2. Khả năng chuyển hóa 2,4-DCP	103
3.7.3. Khả năng phân hủy các hợp chất chứa clo của vi khuẩn khử sulfate BDN10T đã được làm sạch	104
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	106
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	127
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	129
TÀI LIỆU THAM KHẢO	131
SUMMARY	147

Danh mục các thuật ngữ và ký hiệu viết tắt

2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
Bộ TN-MT	Bộ Tài nguyên và môi trường
CDBF	Chlorodibenzo- <i>p</i> -furan
CP	Chlorophenol
Đ/C	Đối chứng
DBF	Dibenzo- <i>p</i> -furan
DCB	Dichlorobenzene
DCĐ	Dịch chiết đất
DCDD	Dichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
DCP	Dichlorophenol
DD	Dibenzo- <i>p</i> -dioxin
DDD	1-chloro-4-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)ethyl]benzene
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-di(4-chlorophenyl)ethane
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
EPA	Environmental Protection Agency
HCB	Hexachlorobenzene
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MCDD	Monochlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
MT	Môi trường
PAH	Polyaromatic hydrocarbon
PCB	Polychlorobiphenyl
PCDD	Polychlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
PCDD/Fs	Polychlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan
PCDF	Polychlorodibenzo- <i>p</i> -furan
PCE	Tetrachloroethene
PeCDD	Pentachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
RdhA	Reductive dehalogenase
<i>rdhA</i>	Reductive dehalogenase gene
TCB	Tetrachlorobenzene
TCDD	Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin