ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

LÊ TIẾN MẠNH

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY SINH HỌC HYDROCACBON THƠM CỦA MỘT VÀI CHỦNG VI KHUẨN ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ NƯỚC Ô NHIỄM DẦU TẠI QUẢNG NINH

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái nguyên - 2008

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

LÊ TIẾN MẠNH

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY SINH HỌC HYDROCACBON THƠM CỦA MỘT VÀI CHỦNG VI KHUẨN ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ NƯỚC Ô NHIỄM DẦU TẠI QUẢNG NINH

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 - 2008

Lời cảm ơn!

Trước hết tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành, sâu sắc tới TS. Nghiêm Ngọc Minh đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

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 KS. Đàm Thúy Hằng, Thạc Sỹ Nguyễn Bá Hữu những người đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận văn của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để hoàn thành bản luận văn này.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Ban chủ nhiệm khoa, các thầy cô và các bạn đồng nghiệp Khoa Sinh – KTNN đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu tại trường Đại học Sư Phạm - Đại Học Thái Nguyên.

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.

Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin chân thành cảm ơn tất cả sự giúp đỡ quý báu đó!

Hà nội, tháng 9 năm 2008

Học viên

Lê Tiến Mạnh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa có ai công bố trong một công trình nào khác.

Tác giả

Lê Tiến Mạnh

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

MỤC LỤC

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT.....1
DANH MỤC CÁC BẢNG.....2
DANH MỤC CÁC HÌNH.....3
MỞ ĐẦU.....
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 8
1.1 Đặc điểm cơ bản của hợp chất hydrocarbon thơm đa nhân.....8
1.1.1. Tính chất hóa lý 8
1.1.2 Tính độc của PAH và ảnh hưởng của nó tới môi trường sống.....10
1.2. Nguồn gốc phát sinh PAH 13
1.2.1. Hiện trạng ô nhiễm PAH trên thế giới và ở Việt Nam 13
1.2.2. Nguồn gốc phát sinh.....14
1.3. Các biện pháp xử lý tẩy độc PAH 15
1.3.1 Phương pháp hóa lý.....16
1.3.2. Phương pháp phân hủy sinh học.....16
1.4. Phân hủy sinh học các PAH bởi vi sinh vật 19
1.4.1. Vi sinh vật phân hủy PAH 19
1.4.2. Cơ chế phân hủy PAH bởi VSV.....21
1.5. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình phân hủy các hợp chất hydrocarbon thơm đa nhân.....25
1.6. Các phương pháp phân loại vi sinh vật.....29
1.6.1. Phương pháp phân loại truyền thống 29
1.6.2. Phương pháp phân loại bằng sinh học phân tử 30
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....33
2.1. Nguyên liệu và hóa chất 33

2.1.1. Nguyên liệu.....33
2.1.2. Hóa chất 33
2.2. Môi trường nuôi cấy.....33
2.3. Máy móc và thiết bị nghiên cứu.....34
2.4. Phương pháp nghiên cứu 34
2.4.1. Phân lập vi sinh vật trên mẫu nước nhiễm dầu 34
2.4.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn 35
2.4.3. Đánh giá khả năng sử dụng PAH của vi khuẩn.....36
2.4.4. Xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA và catechol 2,3-dioxygenase.....36
2.4.4.1. Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn theo phương pháp của Sambrook, Russell 36
2.4.4.2. Nhân đoạn gen bằng phương pháp PCR.....37
2.4.4.3. Quy trình biến nạp và chọn dòng.....38
2.4.4.4. Phương pháp xác định trình tự gen bằng máy tự động.....40
2.4.4.5. Phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại 41
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 42
3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường chứa PAH.....42
3.2. Đặc điểm hình thái và tế bào của chủng vi khuẩn BQN31 44
3.3. Khả năng sử dụng các loại PAH của chủng vi khuẩn BQN31 45
3.4. Xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng BQN31 49

3.4.1. Tách chiết DNA tổng số và nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR 49
3.4.2. Tách dòng gen mã hóa 16S rRNA từ chủng BQN31 50
3.4.3 Tách DNA plasmid và kiểm tra các dòng khuẩn lạc thích hợp 52
3.4.4. Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn BQN31 54
3.5. Nhân đoạn gen mã hóa catechol 2,3 dioxygenase từ chủng BQN31 57
IV. KẾT LUẬN 62
TÀI LIỆU THAM KHẢO 63

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

bp	Base pair (cặp bazơ)
USEPA	United State Environmental Protection Agency (Cục bảo vệ môi trường Hoa Kỳ)
LB	Luria-Bertani
PCR	Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi trùng hợp)
POP	Persistent Organic Pollutant
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
VSV	Vi sinh vật
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
µl	Microlit
µm	Micromet
PAH	Polycyclic aromatic hydrocacbon (hydrocarbon thơm đa nhân)
ppm	đơn vị một phần triệu (mg/l)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Trang

Bảng 1.1: Tính chất vật lý của một số loại PAH 9
Bảng 1.2: Một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PAH 20
Bảng 1.3: Một số phương pháp phân loại vi sinh vật 30
Bảng 3.1: Số lượng vi khuẩn phân lập được trên môi trường khoáng có bổ sung các hợp chất PAH..... 42
Bảng 3.2. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn 44
Bảng 3.3: phổ UV đo khả năng phân hủy các PAH của chủng BQN31..... 46
Bảng 3.4: Khả năng sử dụng các PAH khác nhau của chủng BQN31 46
Bảng 3.5: Độ tương đồng của chủng BQN31 so với một số đại diện đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế..... 56
Bảng 3.6: Độ tương đồng của đoạn gen mã hóa enzyme catechol 2,3 dioxygenase của chủng BQN31 so với một số đại diện đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế..... 60

DANH MỤC CÁC HÌNH

Trang

Hình 1.1: Cấu trúc hóa học của một số hydrocacbon thơm đa nhân (PAH) 8
Hình 1.2: Các con đường phân hủy PAH ở vi sinh vật 21
Hình 1.3: Ba con đường phân hủy hiếu khí PAH chính của vi khuẩn và nấm 22
Hình 3.1: Khả năng phân hủy phenanthrene của 4 chủng BQN30, BQN31, BQN32, BQN33..... 43
Hình 3.2: Hình thái khuẩn lạc chủng vi khuẩn BQN31..... 45
Hình 3.3: Hình thái tế bào vi khuẩn BQN31 45
Hình 3.4: DNA tổng số của chủng BQN31 50
Hình 3.5: Sản phẩm PCR nhân đoạn gene mã hóa 16S rRNA của chủng BQN31..... 50
Hình 3.6: Kết quả biến nạp chủng BQN31 51
Hình 3.7: Sản phẩm điện di kiểm tra DNA plasmid của các dòng được lựa chọn..... 52
Hình 3.8: Sản phẩm cắt DNA plasmid của dòng số 13 53
Hình 3.9: Sản phẩm làm sạch DNA plasmid dòng số 13 của chủng vi khuẩn BQN31..... 53
Hình 3.10: Trình tự đầy đủ đoạn gen 16S rRNA của chủng BQN31 54
Hình 3.11: Cây phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự các đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng BQN31 và một số chủng vi khuẩn đại diện. Thước đo thể hiện hai nucleotide khác nhau trên 1.000 nucleotide so sánh..... 55