

HỘI THẢO KHOA HỌC

**NGHIÊN CỨU XỬ LÝ CÁC CHẤT KHÓ PHÂN HỦY BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC: TRƯỜNG HỢP ĐIỂN HÌNH VỀ
DIOXIN Ở SÂN BAY BIÊN HÒA**

NCS: Vũ Thị Lan Anh

NỘI DUNG



MỞ ĐẦU



TỔNG QUAN



ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP



KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

LỜI MỞ ĐẦU



MỞ ĐẦU



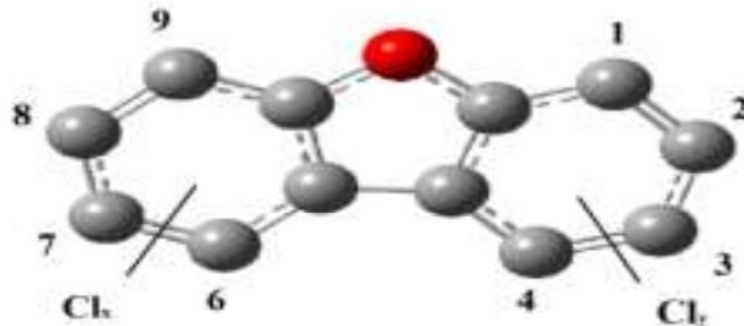


TỔNG QUAN

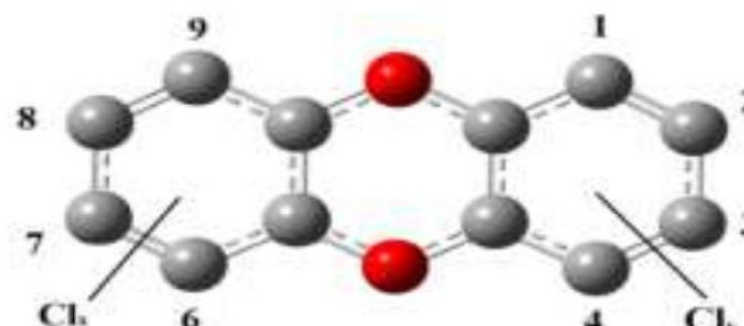
Tổng quan

Dioxin là tên chung để chỉ một nhóm hàng trăm các hợp chất hoá học có chung cấu trúc hoá học nhất định, thuộc nhóm polychlorinated dibenzo para dioxin (**PCDDs**) và polychlorinated dibenzo furans (**PCDFs**).

Tổng số **210** chất này là những nhóm chất độc hại, nguy hiểm nhất được biết đến hiện nay. Trong đó, có **17 chất có liên kết với nguyên tử clo ở vị trí 2,3,7,8** là độc hơn cả. Đây cũng chính là các đối tượng được quan tâm nghiên cứu phân tích và xử lý nhiều nhất.

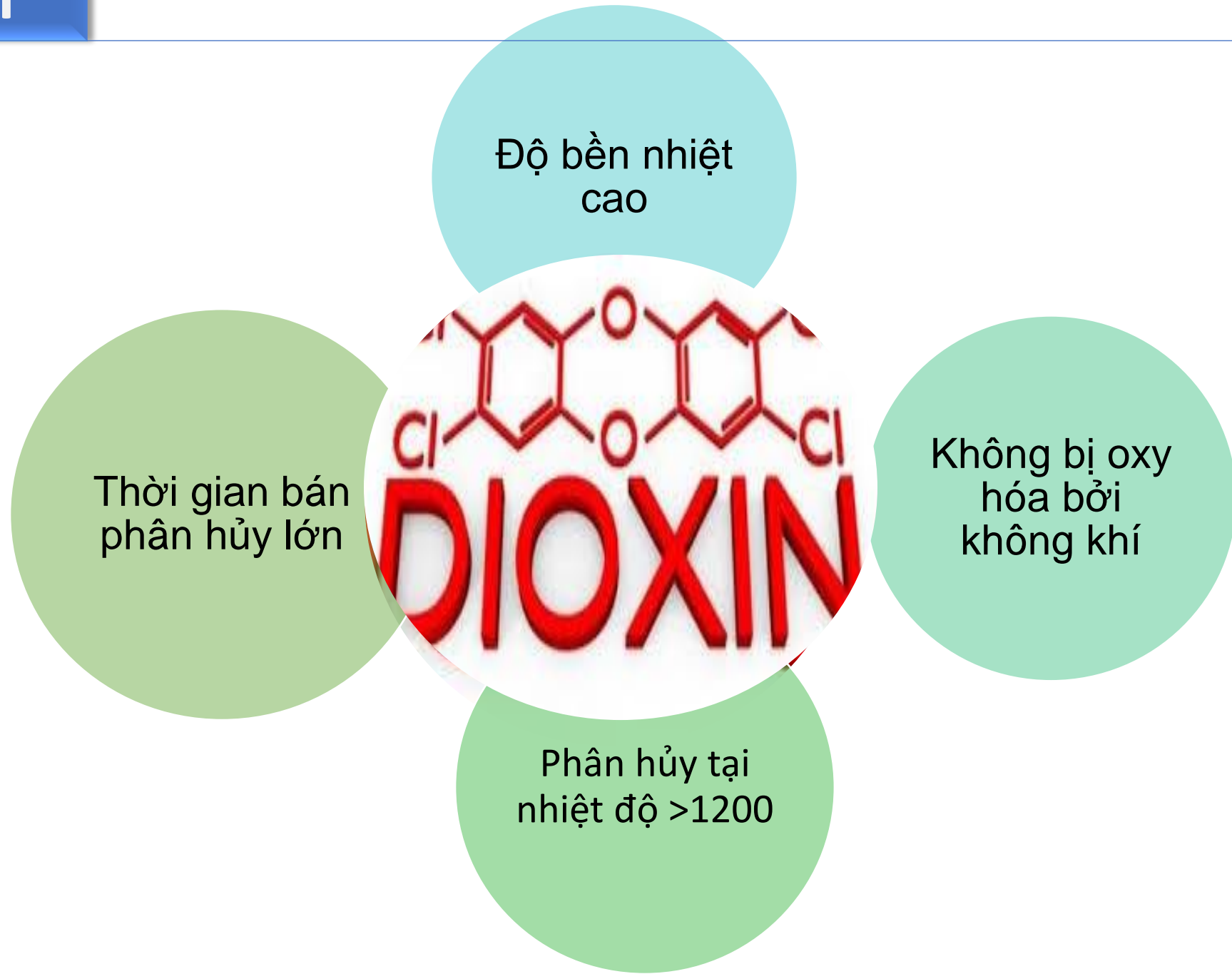


Policlodibenzofuran
(PCDF)

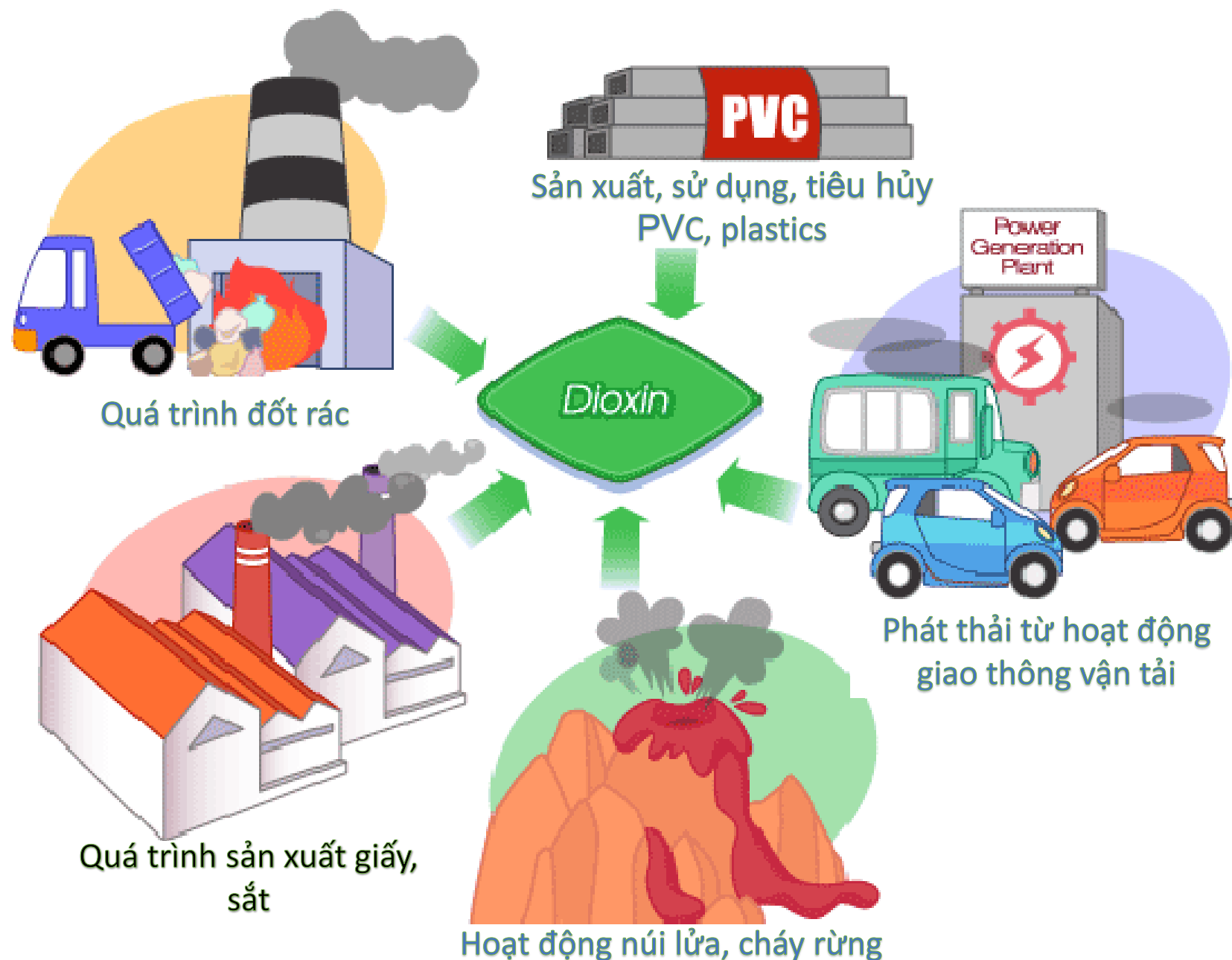


Policlodibenzo-p-dioxin
(PCDD)

Tổng quan

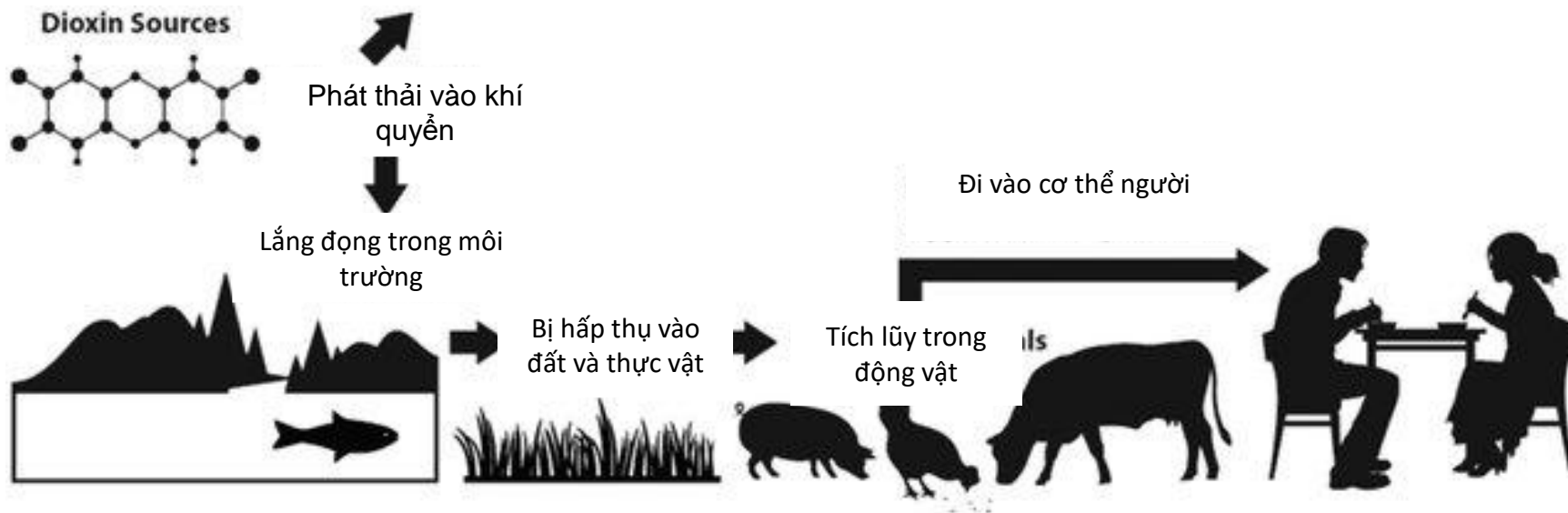
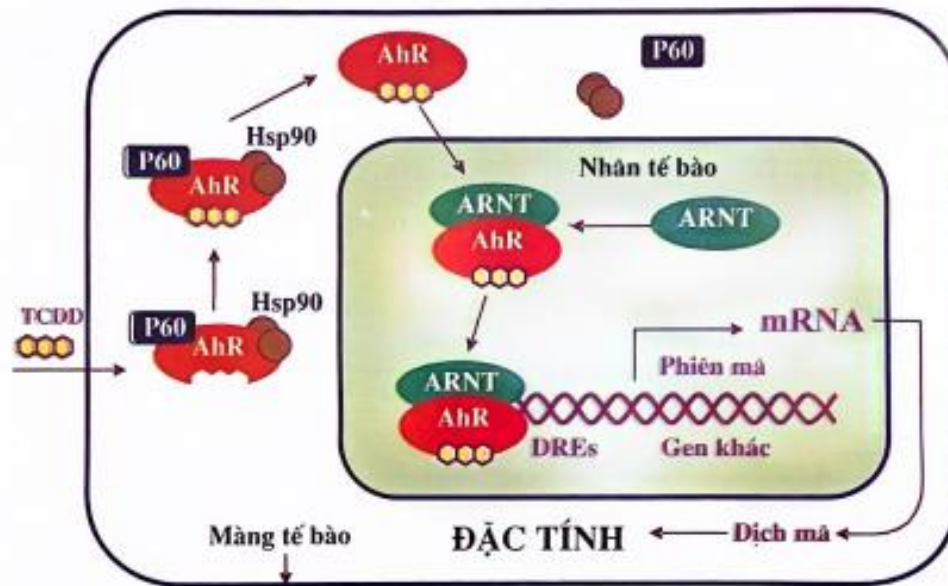


Tổng quan



Tổng quan

Cơ chế tác động của dioxin với con người được hiểu như sau: khi đi vào cơ thể, dioxin di chuyển theo sự tuần hoàn của máu, song thời gian trong máu không lâu, tích lũy chủ yếu trong các mô mỡ.

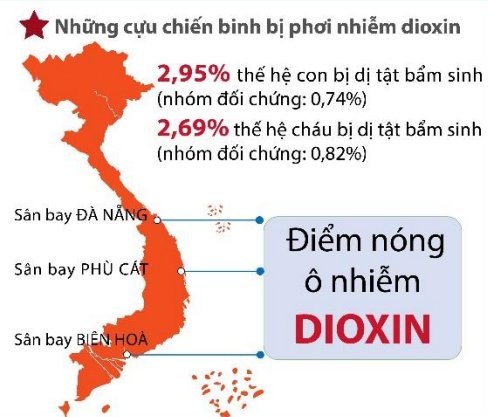


Tổng quan

Trong thời gian chiến tranh Việt Nam, từ năm 1961 đến 1971, quân đội Mỹ đã sử dụng hơn 80 triệu lít chất diệt cỏ.

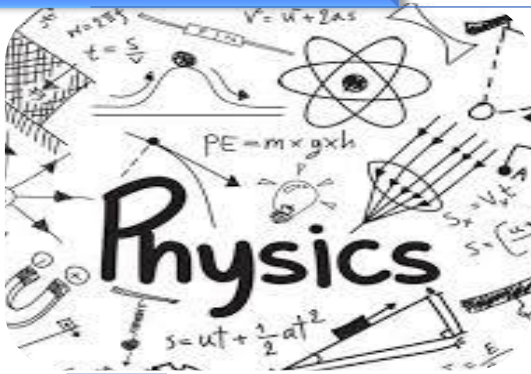
Đến tháng 4/1972, khi phát hiện ra trong chất diệt cỏ có dioxin, Quân đội Mỹ đã tổ chức thu hồi 25.200 thùng (khoảng 5.241.600 lít) chất da cam và vận chuyển về đảo Johnston ở Thái Bình Dương bằng đường biển trong chiến dịch “Pacer Ivy” và tiêu hủy số này vào tháng 7, tháng 8 năm 1977 trong chiến dịch “Pacer HO” (Pacer for Herbicide Orange).

Trong cuộc chiến tranh Mỹ gây ra, quân đội Mỹ và đồng minh đã rải xuống Việt Nam hơn 80 triệu lít chất độc hóa học, trong đó 61% là chất da cam chứa 366kg dioxin. Chất độc đó đã gây ra thảm họa khủng khiếp đối với con người và môi trường sinh thái.

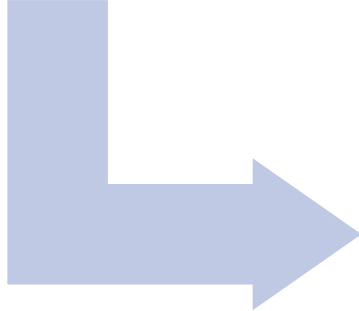


Nguồn: Bộ Tài nguyên và Môi trường, Ban chỉ đạo 3, Hội nạn nhân Chất độc da cam 3

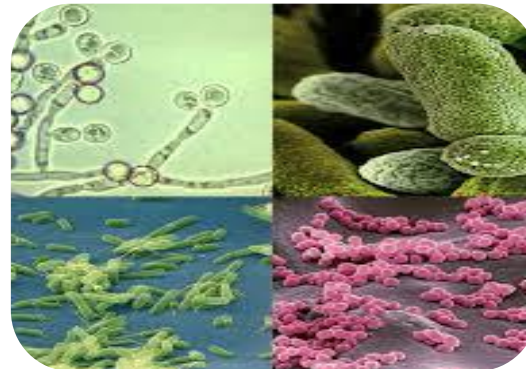
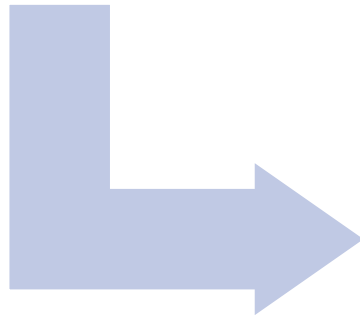
<http://infographics.vn/>



- Phương pháp vật lý



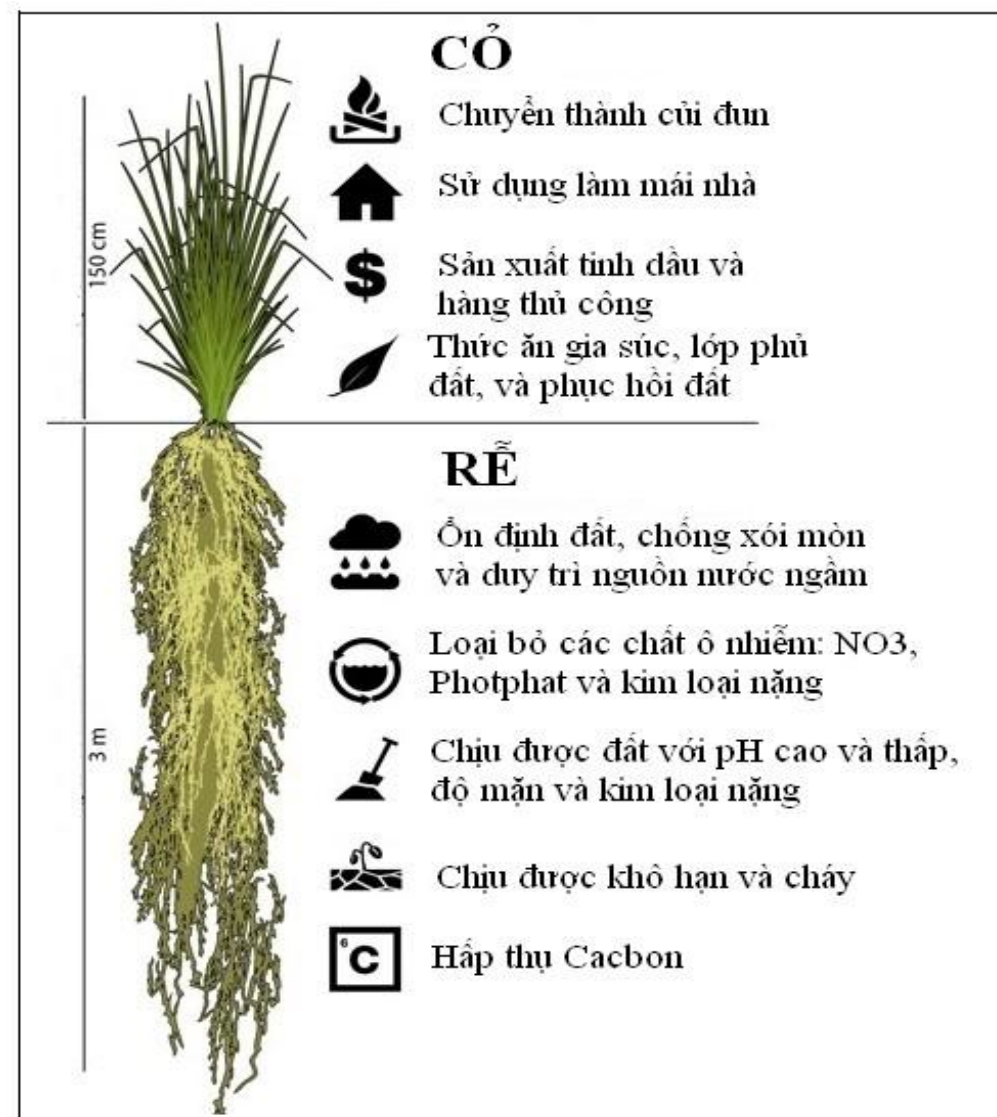
- Phương pháp hóa học



- Phương pháp sinh học

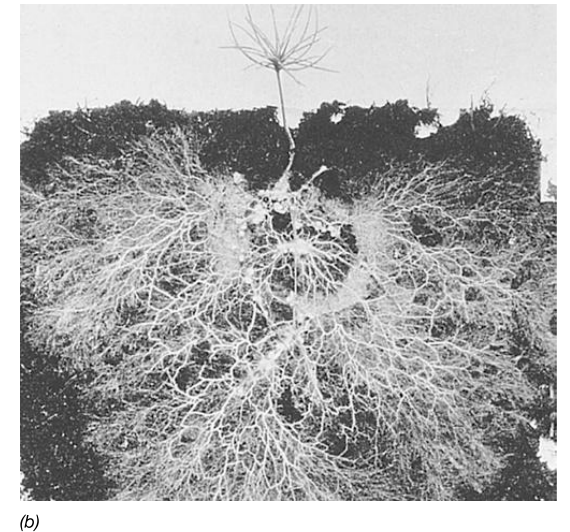
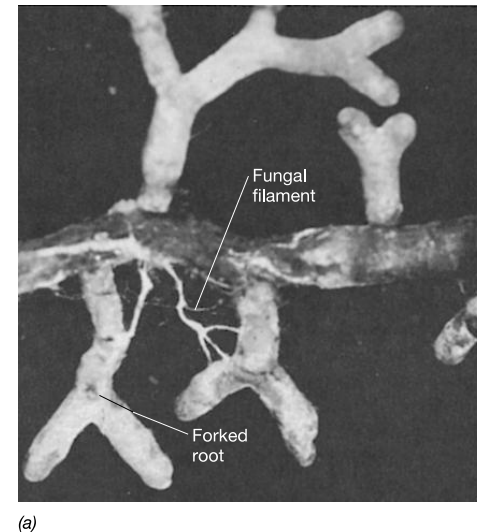
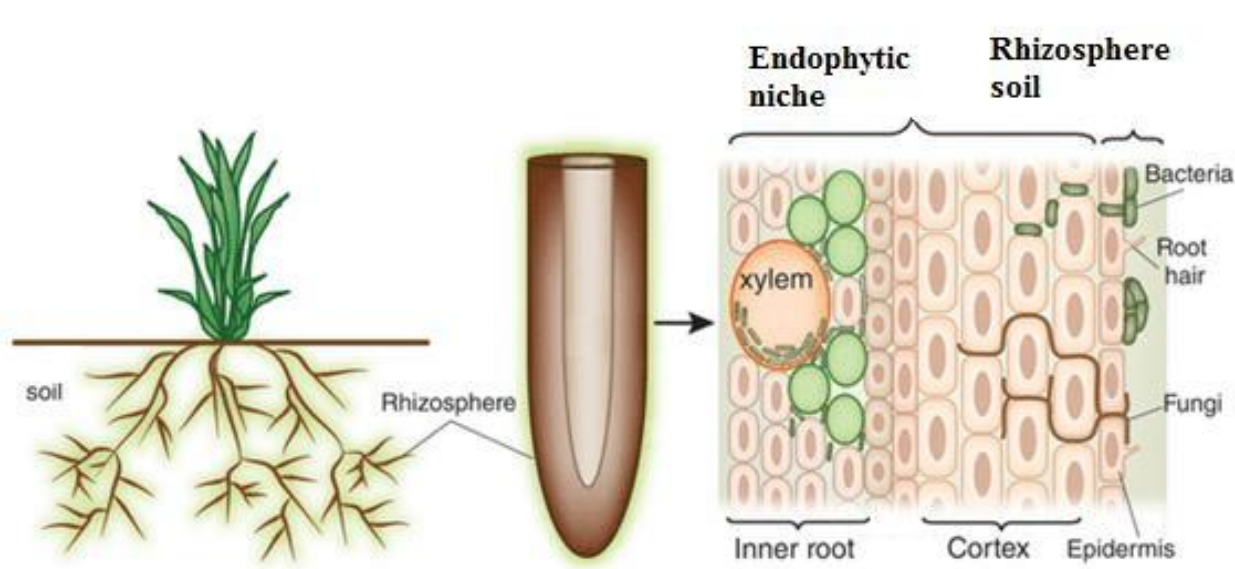
Tổng quan

Cỏ Vetiver thuộc nhóm thực vật C4, sử dụng CO_2 hiệu quả hơn theo con đường quang hợp bình thường, thích hợp nhất dưới ánh sáng, không chịu được bóng râm. Cỏ Vetiver có thể sinh trưởng và phát triển tốt trên nhiều loại đất, có sức chống chịu tốt với BDKH và điều kiện thời tiết khắc nghiệt.



Tổng quan

Các vi sinh vật nội sinh - Endophytes như tên gọi của chúng cho thấy thường cư trú trong các mô bên trong của cây chủ. Endophytes - thường là vi khuẩn hoặc nấm - sống ở các vị trí giữa và/hoặc nội bào của thực vật.



2.22 Mycorrhizae. (a) Typical ectomycorrhizal root of the pine *Pinus rigida* with filaments of the fungus *Thelephora*
(b) Seedling of *Pinus contorta* (lodgepole pine), showing extensive development of the absorptive mycelium of its fungal partner *Suillus bovinus*. This grows in a fanlike formation from the ectomycorrhizal roots to capture nutrients from the soil. The seedling is about 12 cm high.



ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đất ô nhiễm dioxin



Cỏ Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* L.)



VSV cộng sinh với cỏ Vetiver

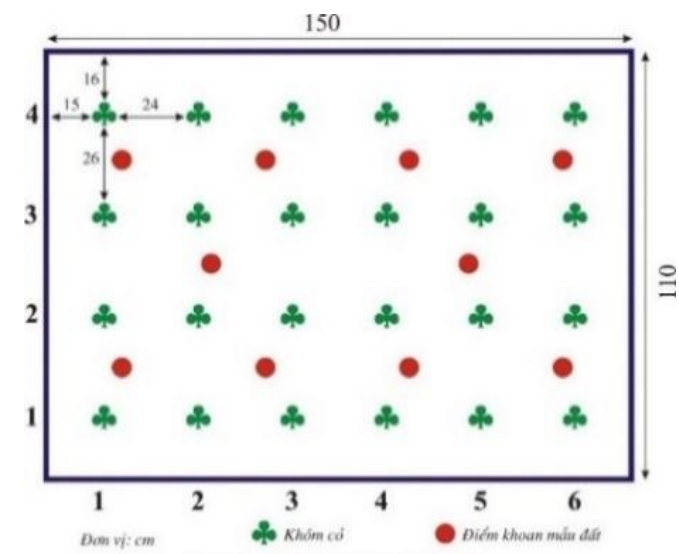
PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Sơ đồ bố trí thí nghiệm

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

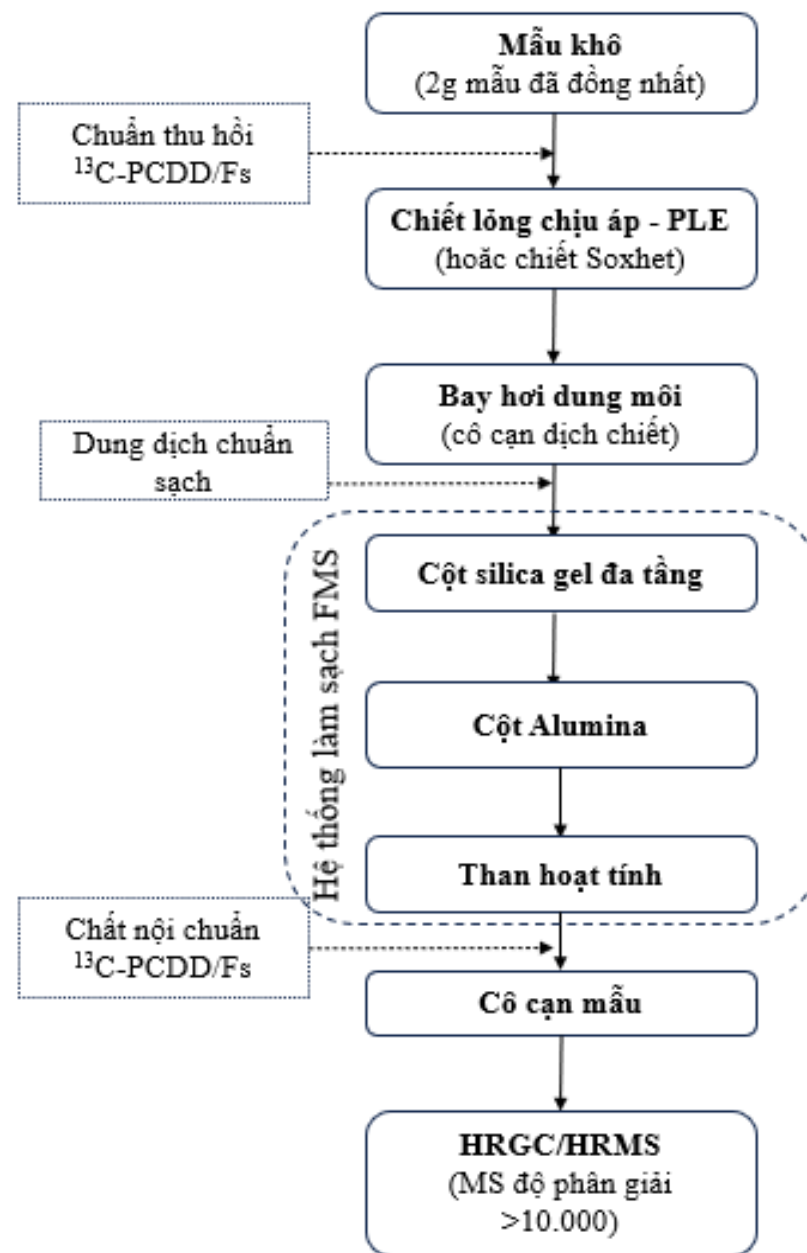
Lấy và gia công mẫu ngoài thực địa



Phương pháp phân tích dioxin

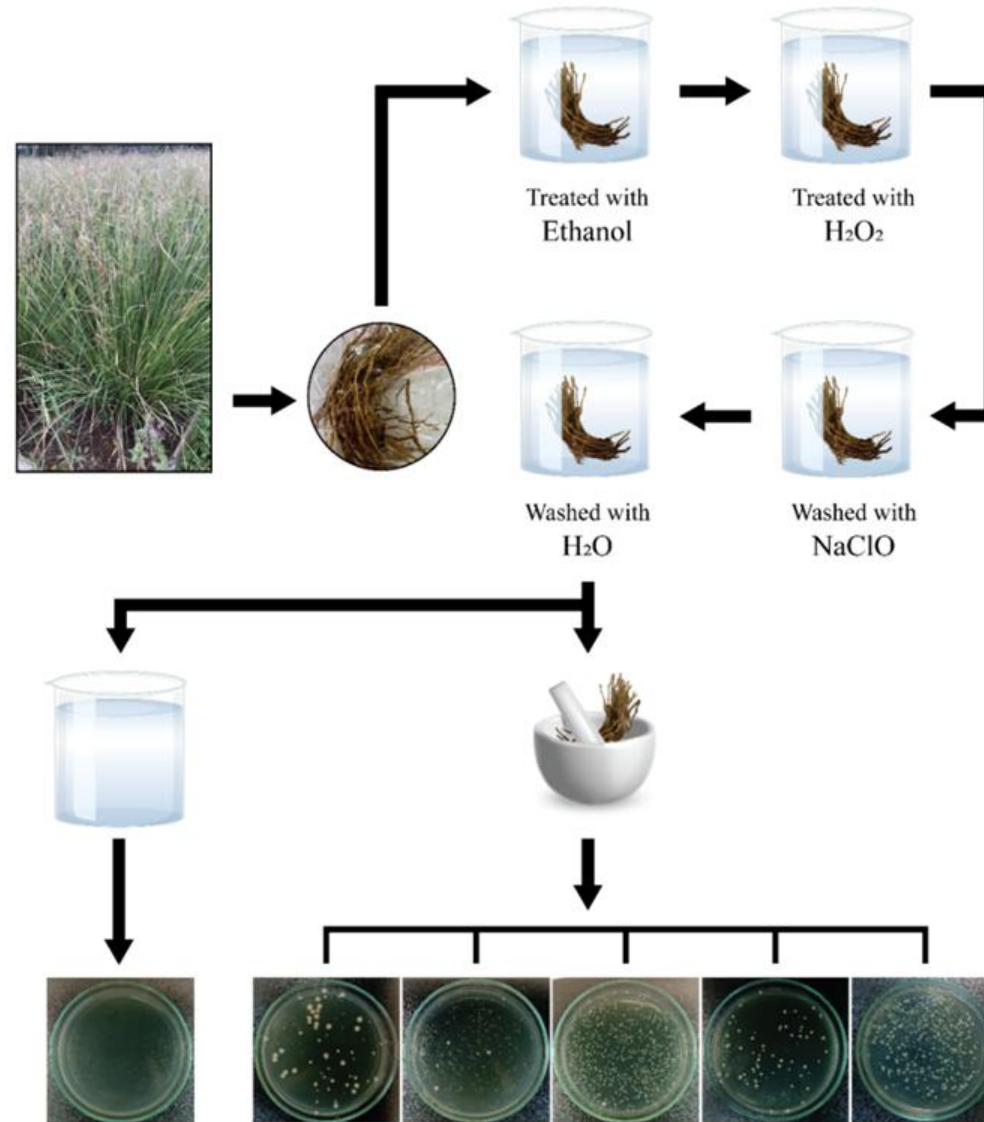
Sắc kí khí ghép nối khối phổ phân giải cao (HRGC/HRMS)

ĐƠN VỊ PHÂN TÍCH: TRUNG TÂM
QUAN TRẮC MÔI TRƯỜNG MIỀN BẮC



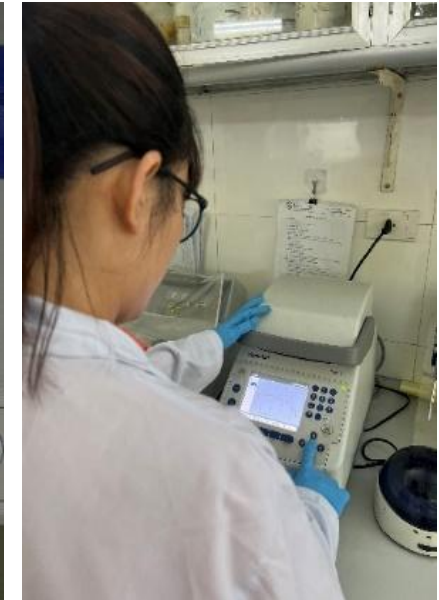
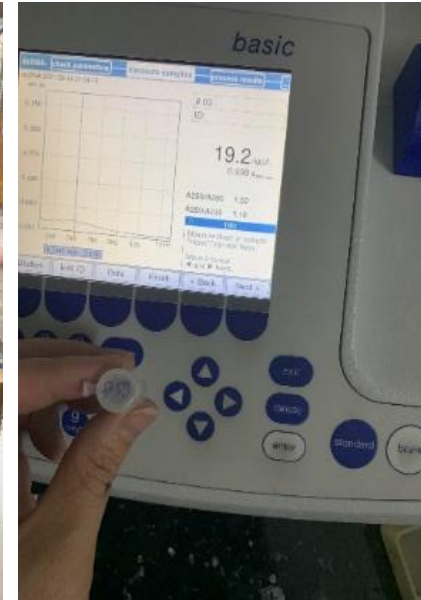
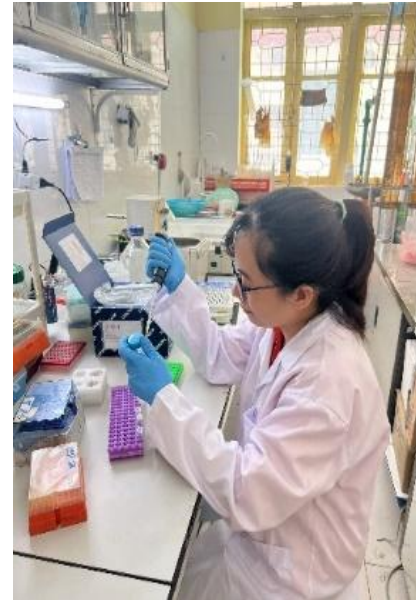
PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phân lập vi sinh vật nội sinh



PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

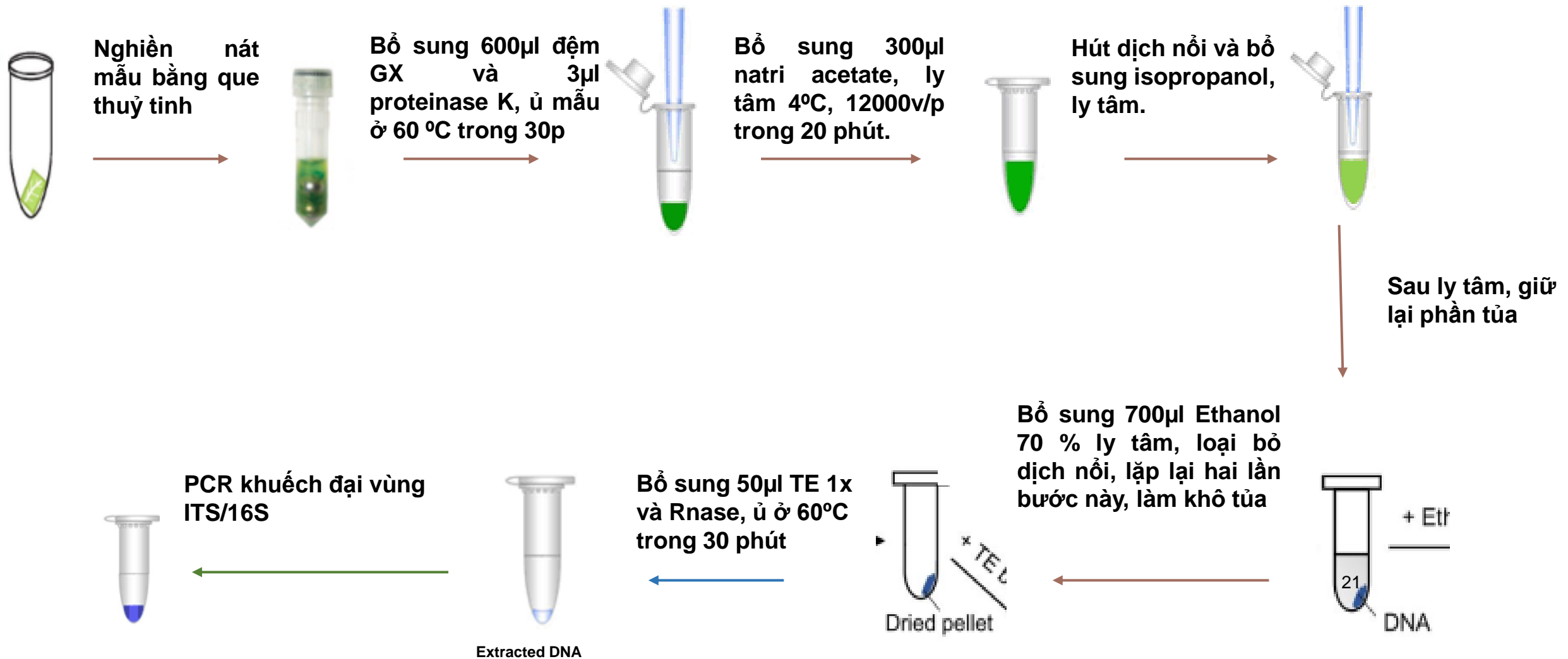
Phương pháp tách DNA tổng số



DNA sau khi tách được kiểm tra bằng máy đo quang phổ NanoDrop. Mẫu đảm bảo chất lượng khi có độ tinh sạch **A260/280 >1,8; A260/230 <2,2. PCR kiểm tra chất lượng DNA.** Các mẫu tách đảm bảo chất lượng được gửi giải trình tự bởi **Azenta Life Sciences.**

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp tách DNA mẫu đơn chủng



Xác định khả năng enzyme laccase

Nuôi cấy các chủng vi nấm trong môi trường PDB ở 30°C trong 3 ngày



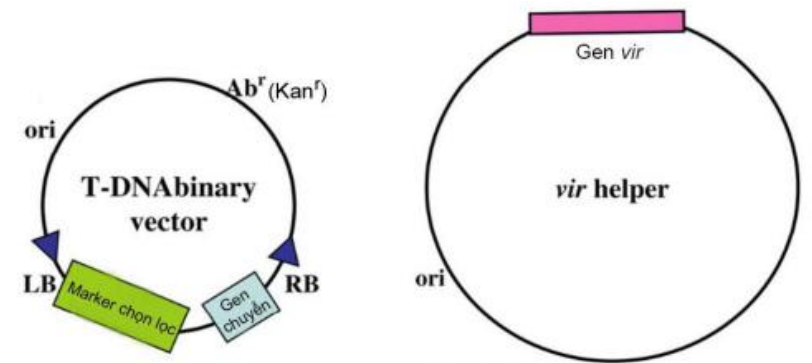
Ly tâm 6000v/p ở 4°C
trong 20 phút

Hỗn hợp phản ứng gồm 800 μ l đệm acetate 0,5 M, pH 5,0; 100 μ l ABTS 5 mM trong đệm McIlvaine; 100 μ l dịch enzyme.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Kỹ thuật chuyển gen

Gen được đề tài chọn sử dụng là gen mã hóa huỳnh quang xanh (GFP). Gen GFP có nguồn gốc từ loài sứa *Aequorea victoria*. Gen GFP có chiều dài 720 bp. GFP mã hóa protein có kích thước 238 axit amin (26,9 kDa). Protein này phát ánh sáng huỳnh quang màu xanh lá cây khi tiếp xúc với ánh sáng bước sóng 509 nm. Trong lĩnh vực sinh học phân tử, GFP thường được đưa vào tế bào thông qua các kỹ thuật chuyển gen và sự tích hợp của GFP trong hệ gen của tế bào 18 có thể đủ bền vững qua các thế hệ sau.





KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả

Đánh giá sự suy giảm hàm lượng dioxin

Với thí nghiệm trong nhà

Lô thí nghiệm	Hàm lượng dioxin (ppt TEQ)				
	Ban đầu	6 tháng	11 tháng	18 tháng	24 tháng
Lô đất trồng cỏ					
Trung bình	511,00	408,33	529,67	471,67	420,56
SEM	38,00	18,48	37,92	23,15	38,09
Lô đất không trồng cỏ					
Trung bình	505,33	401,67	587,33	483,67	431,43
SEM	14,52	49,17	135,57	39,41	15,33

- Ở các lô trồng cỏ, hàm lượng dioxin giảm **17,8%**.
- Ở các lô thí nghiệm không trồng cỏ, hàm lượng dioxin cũng giảm **14,6%**.

So sánh với thí nghiệm tại hiện trường

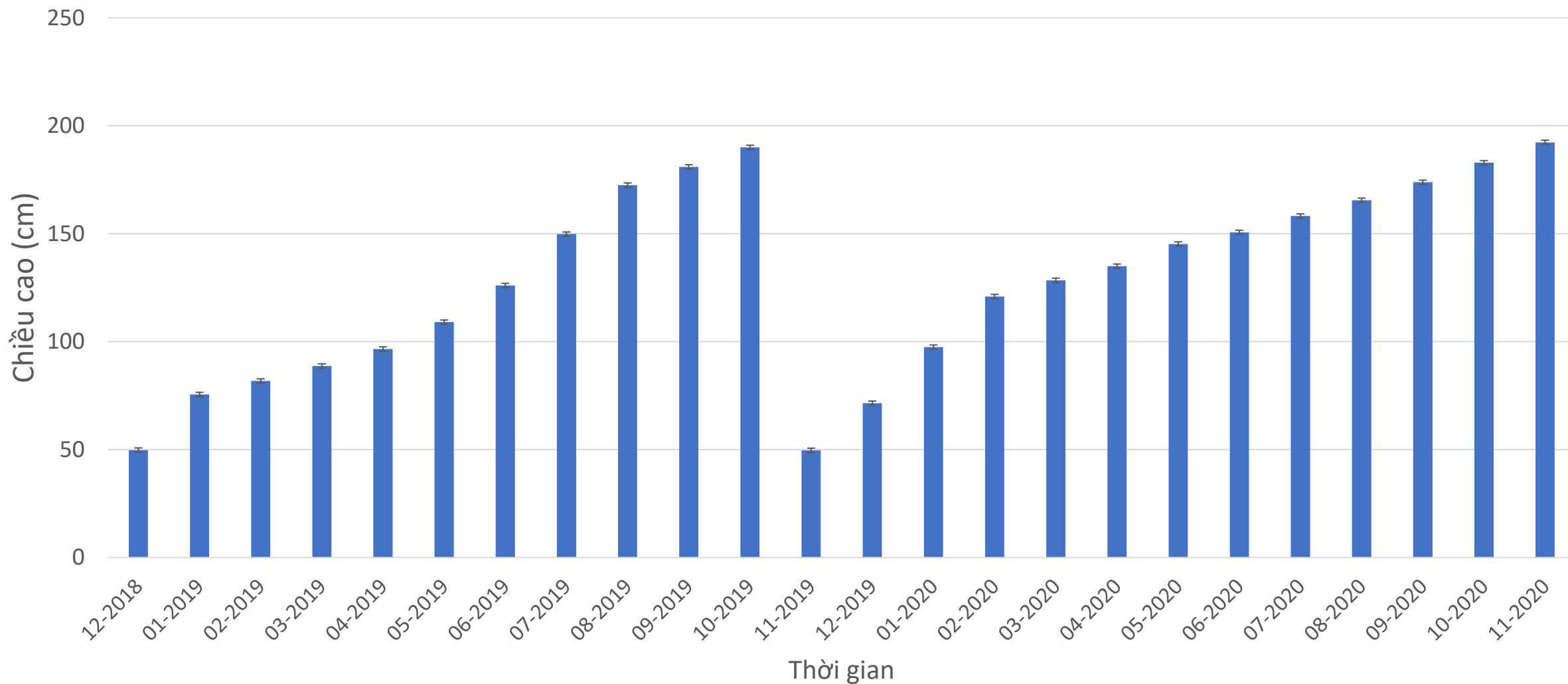
Lô thí nghiệm	Hàm lượng dioxin (ppt TEQ)					
	Ban đầu	6M	11M	18M	24M	29M
Lô thí nghiệm trồng cỏ						
Trung bình	980,33	840,00	751,33	772,67	597,54	653,33
SEM	114,02	110,27	2,19	22,40	25,12	39,19
Lô thí nghiệm không trồng cỏ						
Trung bình	2333,00	2325,33	2111,33	2147,67	2039,26	2016,67
SEM	425,24	350,74	499,19	655,83	548,01	534,12

Với thí nghiệm trồng cỏ ngoài trời hàm lượng dioxin trong đất **giảm 33%**.

Với thí nghiệm không trồng cỏ ngoài trời hàm lượng dioxin trung bình đã **giảm 13%**.

Kết quả

Sự phát triển của cỏ

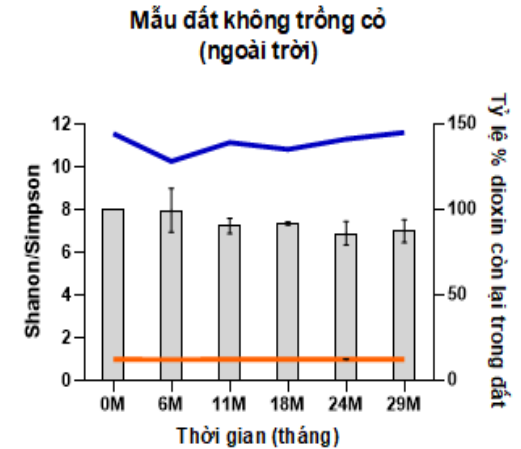
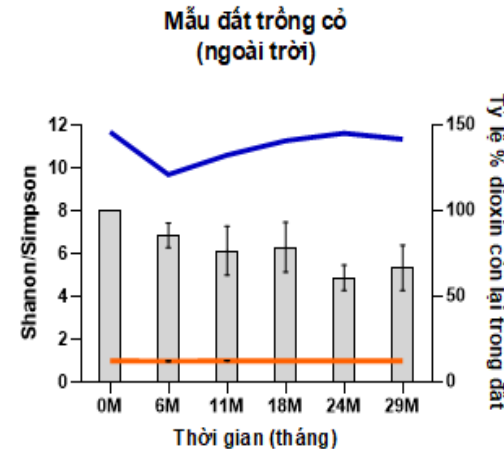
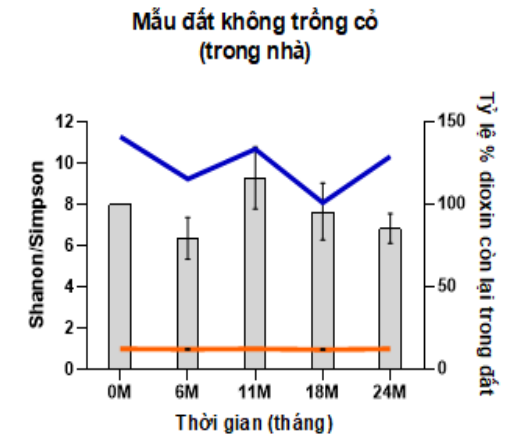
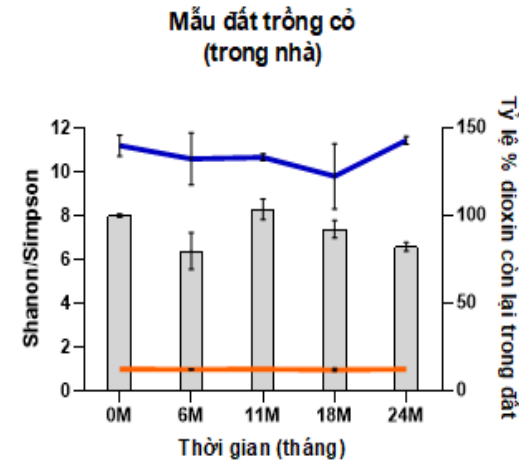


Lô thí nghiệm	Hàm lượng dioxin (ppt TEQ)				
	Ban đầu	6 tháng	11 tháng	18 tháng	24 tháng
Mẫu rẽ					
Trung bình	115,67	166,90	215,67	377,00	364,60
SEM	2,75	15,01	5,18	11,34	16,20
Mẫu chòi					
Trung bình	1,15	4,72	2,99	0,86	0,81
SEM	0,03	0,42	0,14	0,04	0,05

Kết quả

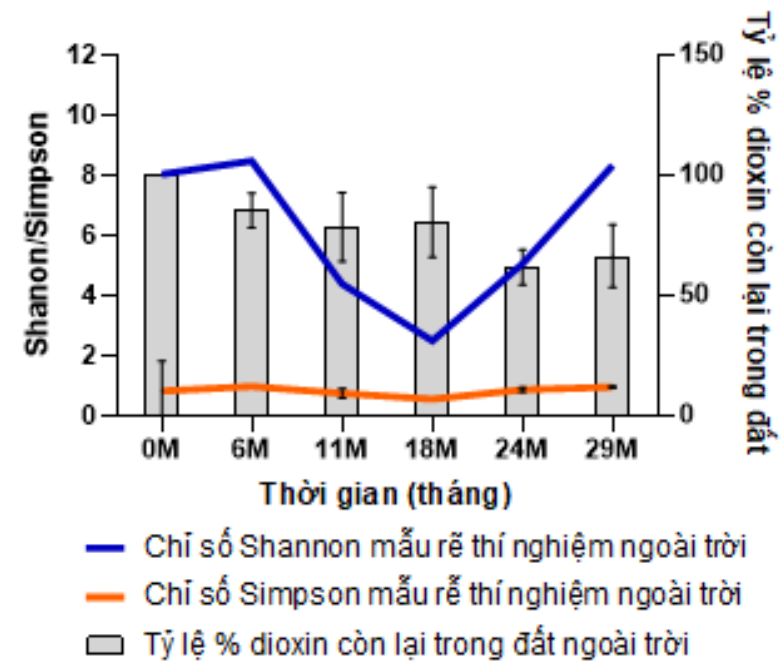
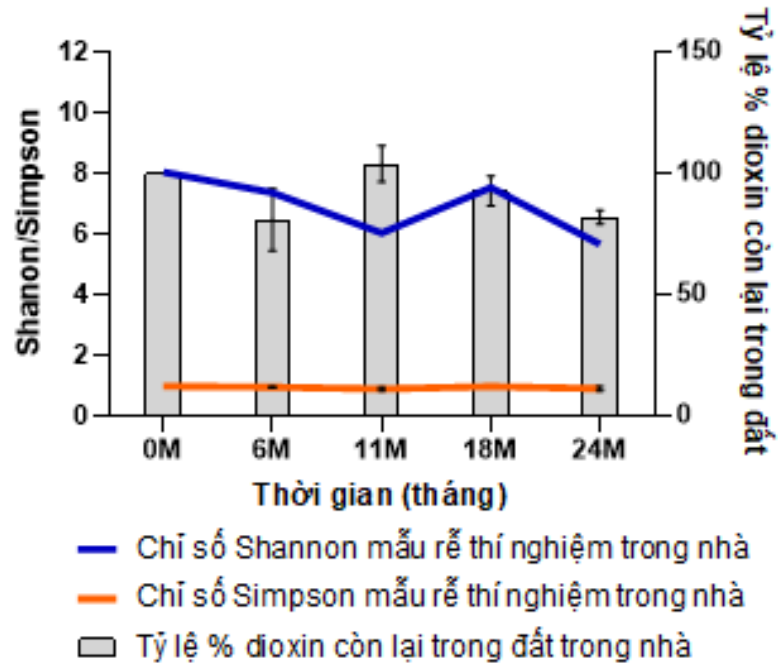
Ở lô thí nghiệm ngoài hiện trường, nồng độ dioxin có sự thay đổi rõ rệt, mức độ đa dạng sinh học của vi sinh vật trong đất cũng thay đổi ($p < 0,05$).

Với các lô thí nghiệm trong nhà, nồng độ dioxin và mức độ đa dạng sinh học của vi sinh vật trong đất không có sự tương quan ($p > 0,05$).



- Chỉ số Shannon của vi khuẩn trong mẫu đất
- Chỉ số Simpson của vi khuẩn trong mẫu đất
- Tỷ lệ % dioxin còn lại trong đất

Kết quả



Đa dạng vi khuẩn mẫu rễ và mức độ suy giảm dioxin

Ở thí nghiệm ngoài hiện trường, sự biến động của **VSV nội sinh trong rễ** có với sự giảm dioxin có mối tương quan với nhau ($p < 0,05$).

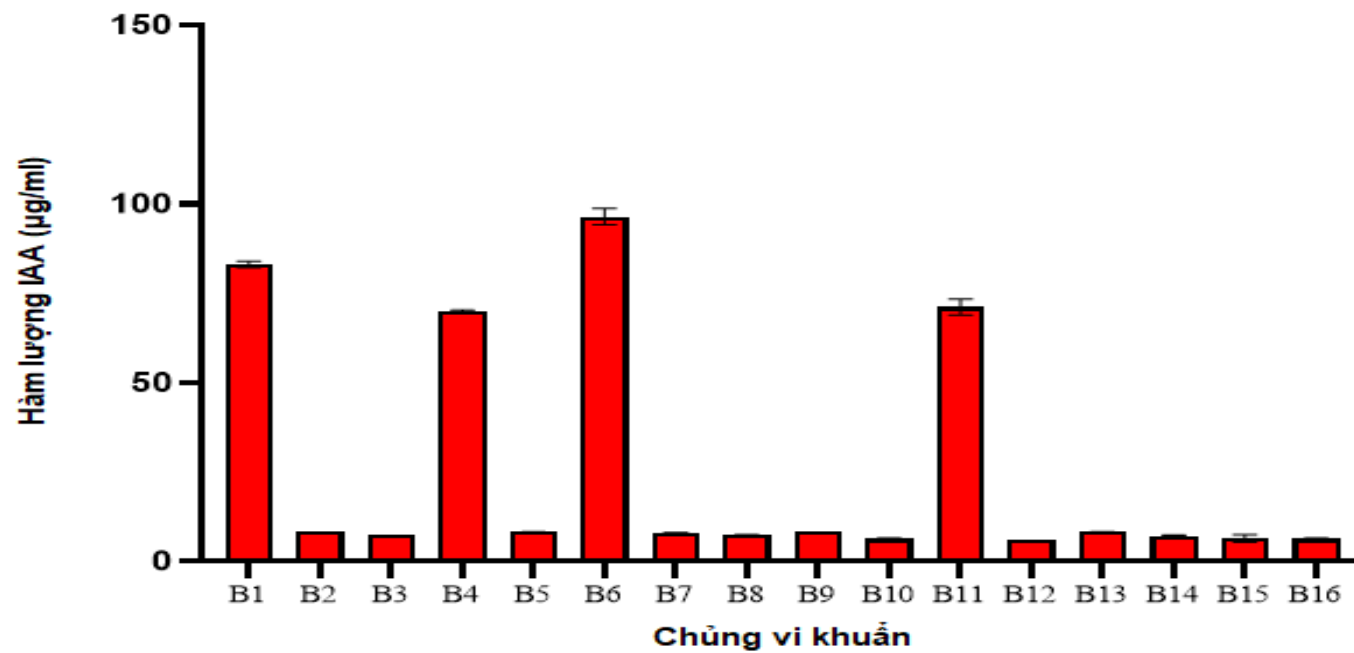
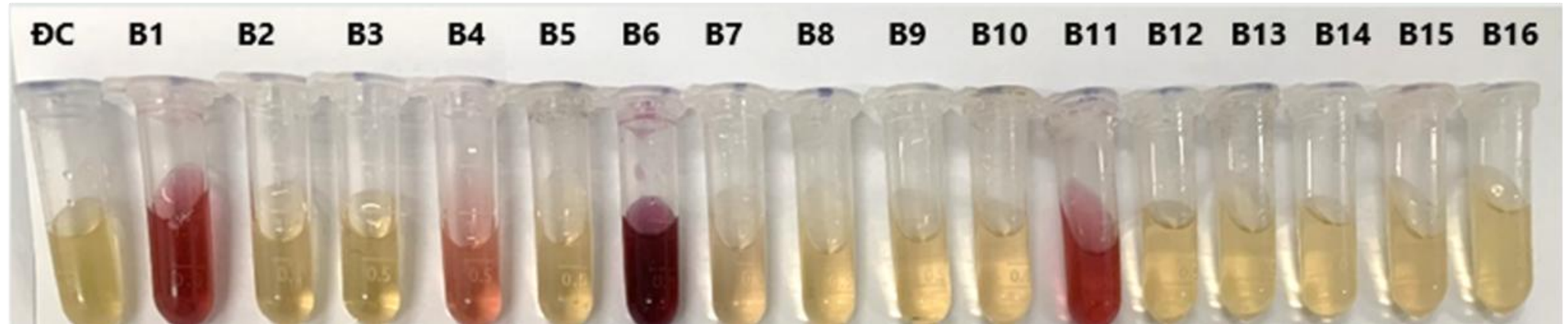
Trong khi đó, ở thí nghiệm trong nhà, sự biến động của VSV nội sinh trong rễ có với sự giảm dioxin không có mối tương quan với nhau ($p > 0,05$).

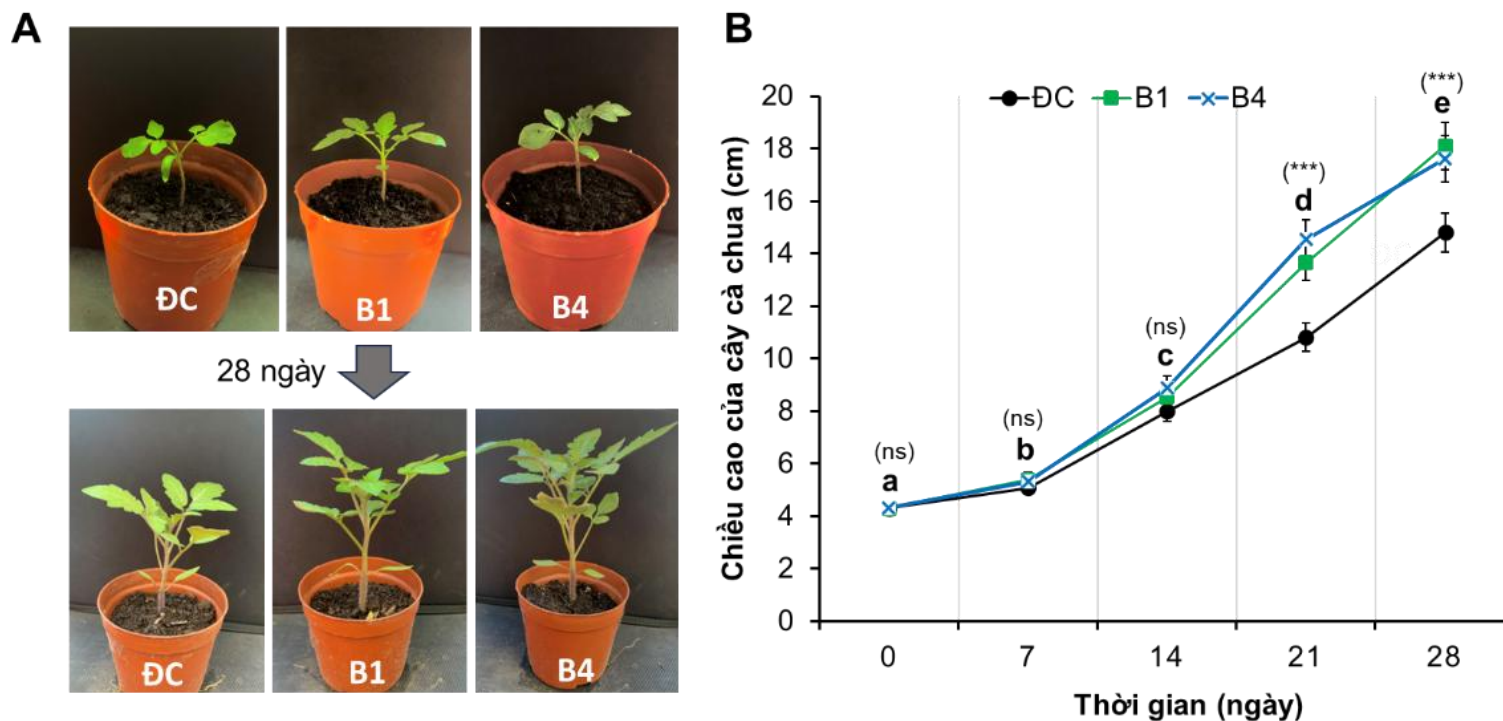
Kết quả

Phân lập, định danh 16 chủng vi khuẩn nội sinh

Chủng vi khuẩn (Ký hiệu)	Tương đồng về trình tự (%)	Mã số của trình tự tương đồng trên Genbank	Tên loài tương đồng
B1	100	MT509531	<i>Klebsiella variicola</i>
B2	100	MH559568	<i>Priestia megaterium</i>
B3	100	MN420979	<i>Citrobacter freundii</i>
B4	99,87	MZ676567	<i>Enterobacter cloacae</i>
B5	100	CP133753	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B6	100	MT613371	<i>Enterobacter cloacae</i>
B7	100	CP042551	<i>Enterobacter hormaechei</i>
B8	100	OR793900	<i>Priestia megaterium</i>
B9	100	OR793125	<i>Bacillus cereus</i>
B10	99,76	MT111594	<i>Enterobacter cloacae</i>
B11	100	MT613375	<i>Enterobacter asburiae</i>
B12	100	CP138336	<i>Bacillus cereus</i>
B13	100	CP138336	<i>Bacillus cereus</i>
B14	100	MN069331	<i>Serratia marcescens</i>
B15	100	CP138336	<i>Bacillus cereus</i>
B16	100	MG461554	<i>Serratia marcescens</i>

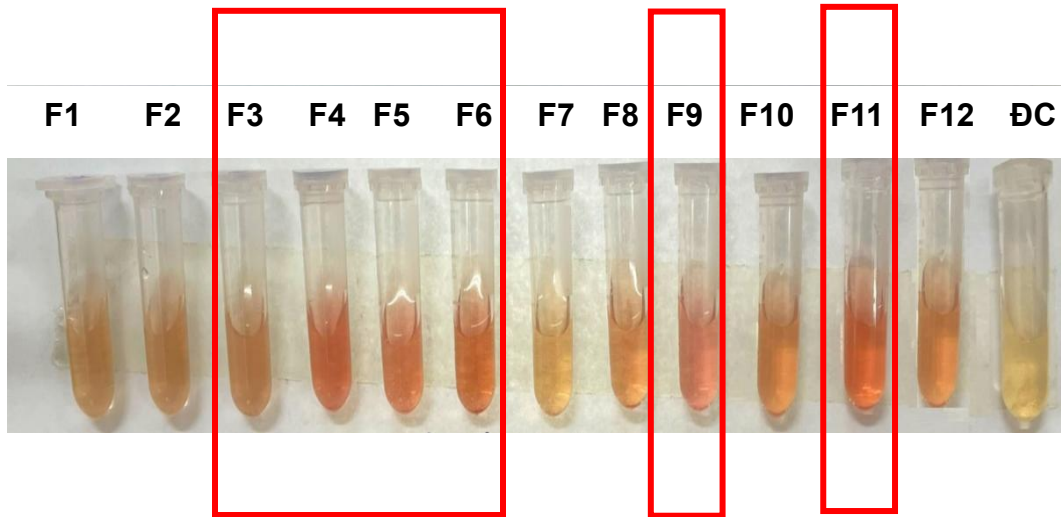
A





Kết quả dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị \pm độ lệch chuẩn. Phân tích ANOVA một chiều. Các chữ cái viết thường biểu thị sự khác biệt đáng kể khi so sánh giá trị trung bình của thực vật ở các thời điểm khác nhau. Dấu (***) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) giữa chiều cao cây được thử nghiệm và chiều cao cây đối chứng; (ns) cho thấy sự khác biệt không đáng kể.

Ký hiệu chủng	Tương đồng về trình tự ITS (%)	Tên loài tương đồng
F1	96,75	<i>Scytalidium sp.</i>
F2	96,14	<i>Scytalidium sp.</i>
F3	99,83	<i>Trichoderma harzianum</i>
F4	99,44	<i>Curvularia lunata</i>
F5	100,00	<i>Curvularia lunata</i>
F6	99,01	<i>Epicoccum sorghinum</i>
F7	100,00	<i>Fusarium falciforme</i>
F8	100,00	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>
F9	99,62	<i>Curvularia lunata</i>
F10	96,36	<i>Scytalidium sp.</i>
F11	99,83	<i>Trichoderma harzianum</i>
F12	85,35	<i>Scytalidium sp.</i>

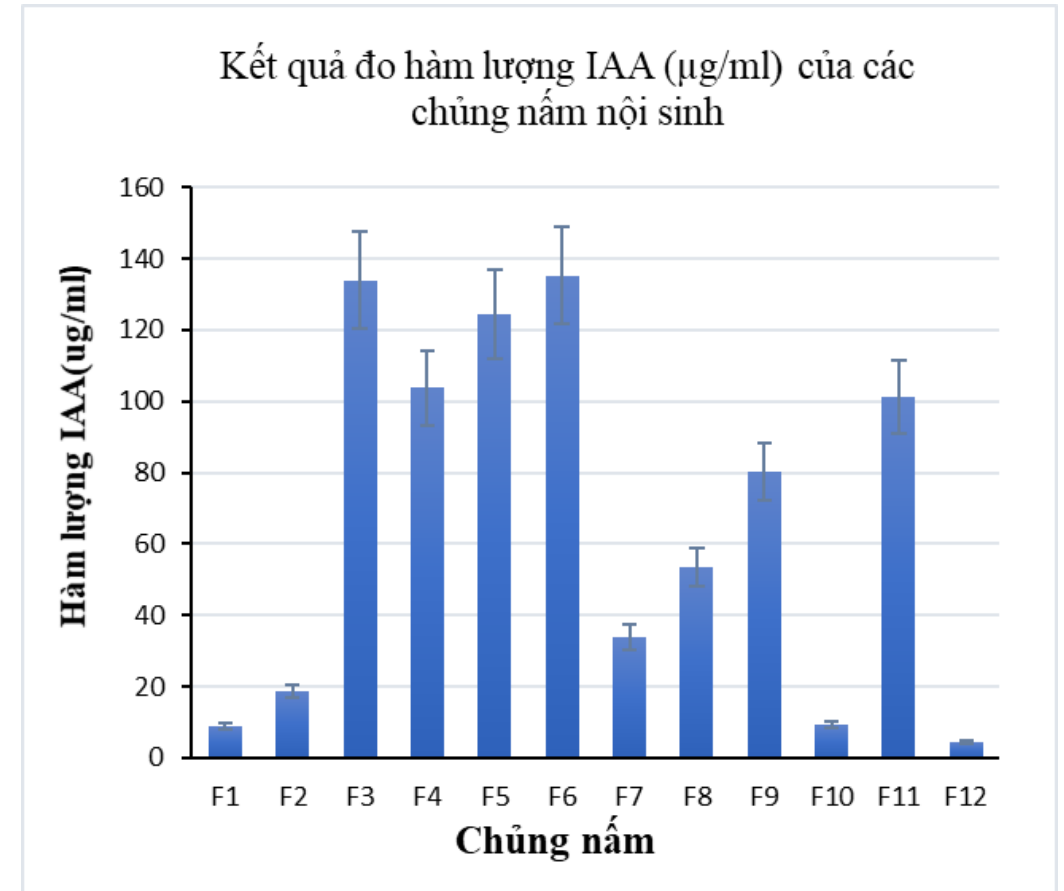


F3, F11: *Trichoderma harzianum*

F4, F5, F9: *Curvularia lunata*

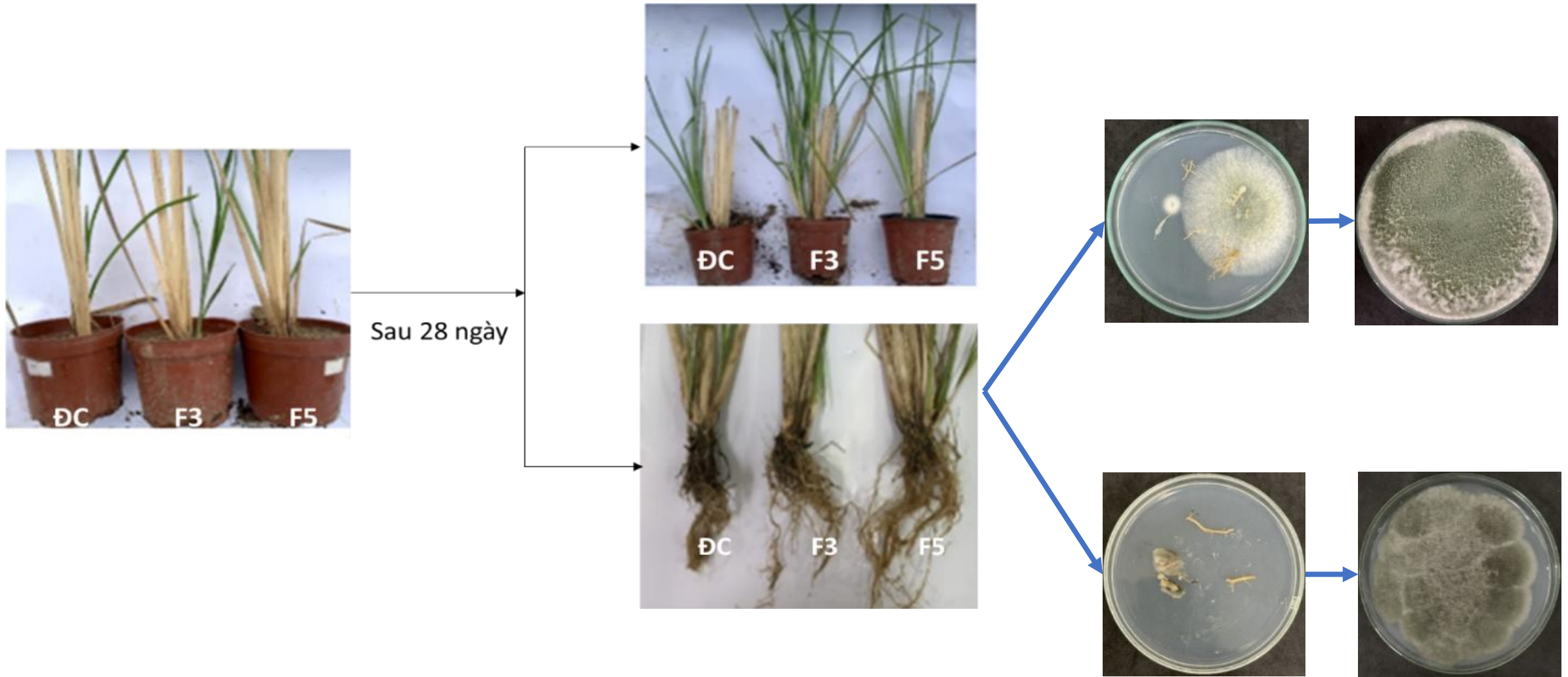
F6: *Epicoccum sorghinum*

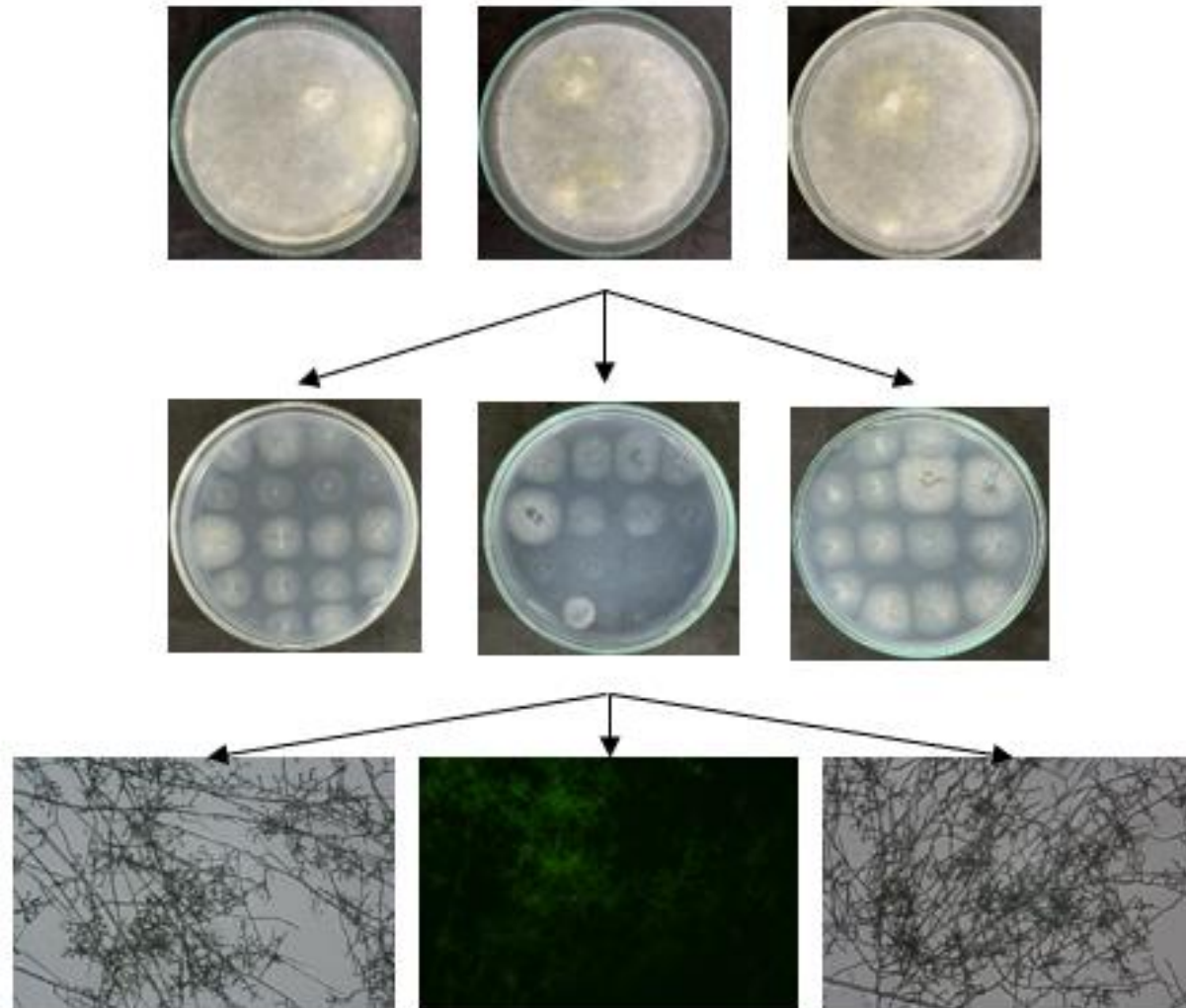
F8: *Microsphaeropsis arundinis*

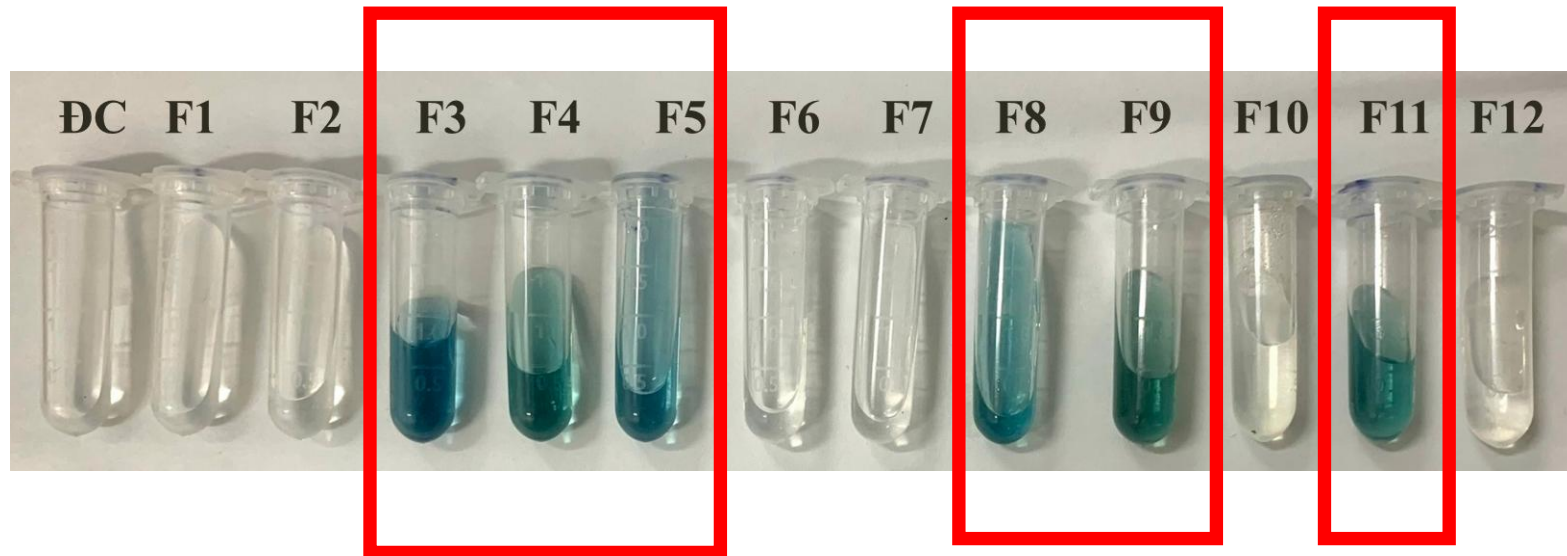


Kết quả

Kích thích sinh trưởng cỏ Vetiver và tái phân lập



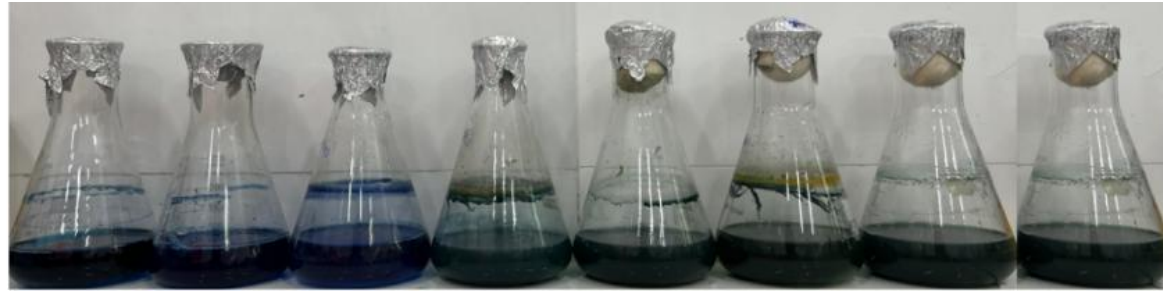




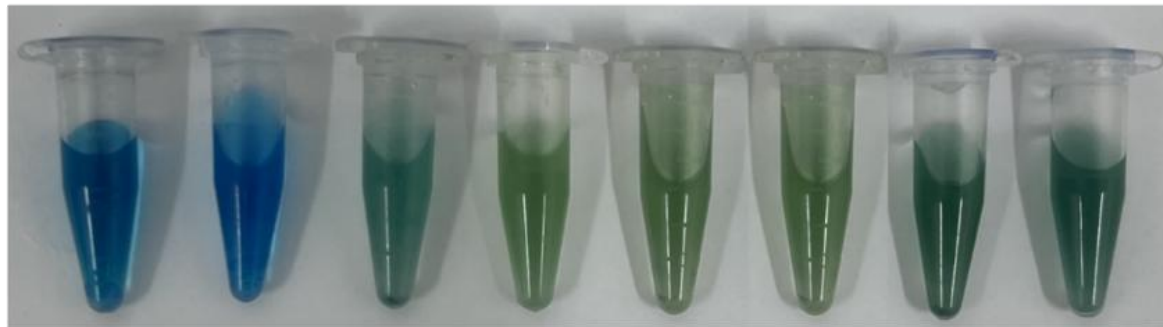
F3, F11 : *T. harzianum*
F4, F5, F9 : *C. lunata*
F8: *Microsphaeropsis arundinis*

Kết quả

Thử khả năng sinh làm mất màu thuốc nhuộm



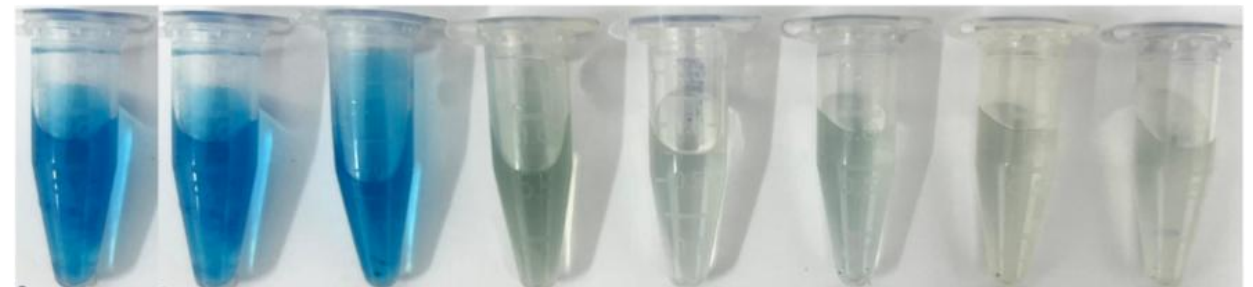
0D 1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d



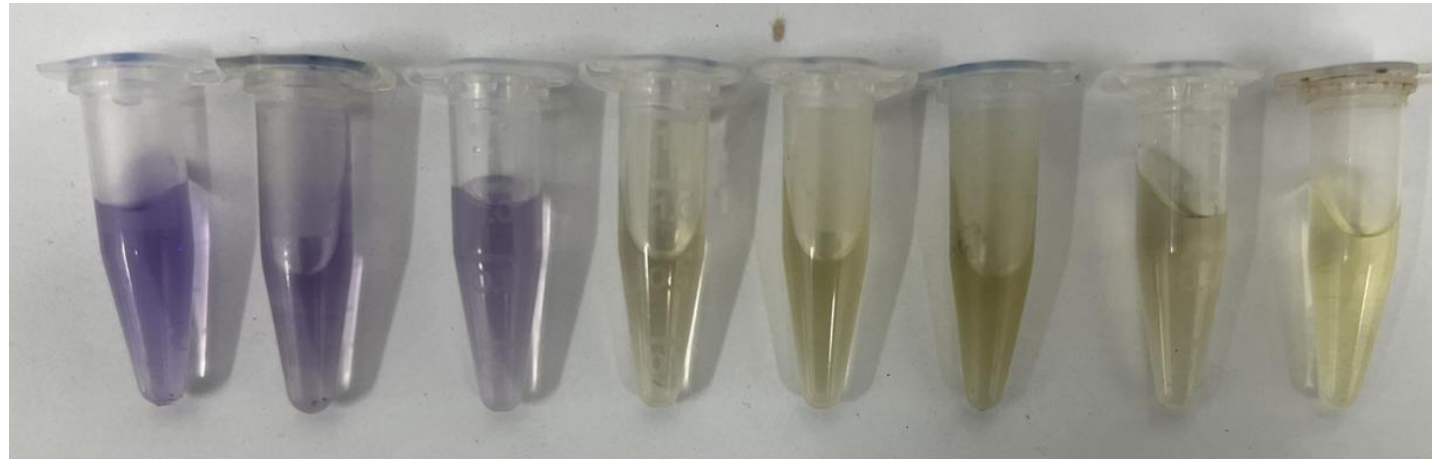
0D 1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d



0D 1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d

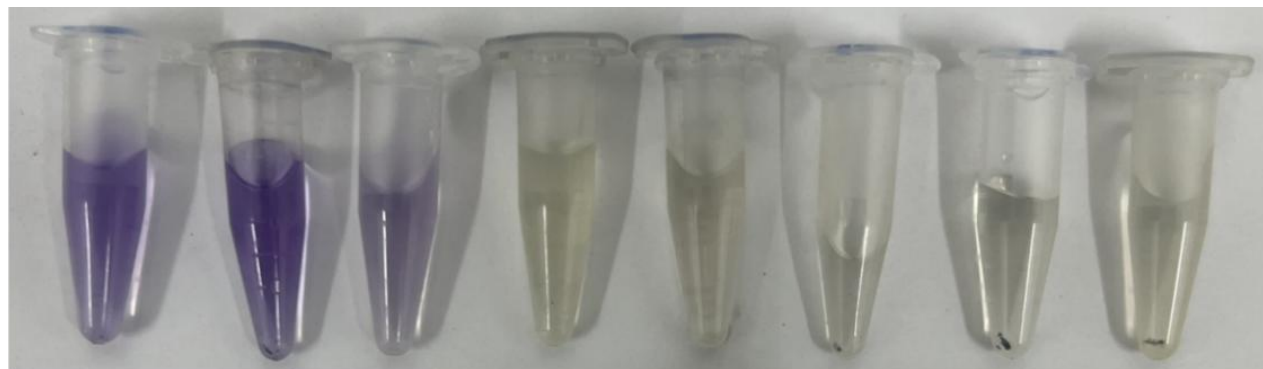


0D 1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d



0d 1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d

Kết quả làm mất màu tím kết tinh của F3



0d 1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d

Kết quả làm mất màu tím kết tinh của F5



KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Cỏ Vetiver giúp giảm nhẹ ô nhiễm dioxin trong đất.
2. Kết quả phân tích metagenomic cho thấy mức độ đa dạng của quần xã VSV trong đất ở thí nghiệm ngoài trời và **VSV nội sinh** có sự **biến động tỷ lệ với sự biến động của hàm lượng dioxin**. Đặc biệt, vi khuẩn nội sinh có sự biến động rõ rệt khi hàm lượng dioxin giảm.

KẾT LUẬN

3. Bằng phương pháp nuôi cấy trong phòng thí nghiệm đã phân lập, định danh, xác định hoạt tính vai trò của **12 chủng vi nấm** và **16 chủng vi khuẩn** nội sinh. Tiến hành thử hoạt tính lựa chọn được 02 chủng vi nấm (*Trichoderma harzianum* F3; *Curvularia lunata* F5) và 02 chủng vi khuẩn (*Klebsiella variicola* B1; *Enterobacter cloacae* B4) có khả năng sinh enzyme kích thích sinh trưởng cao.

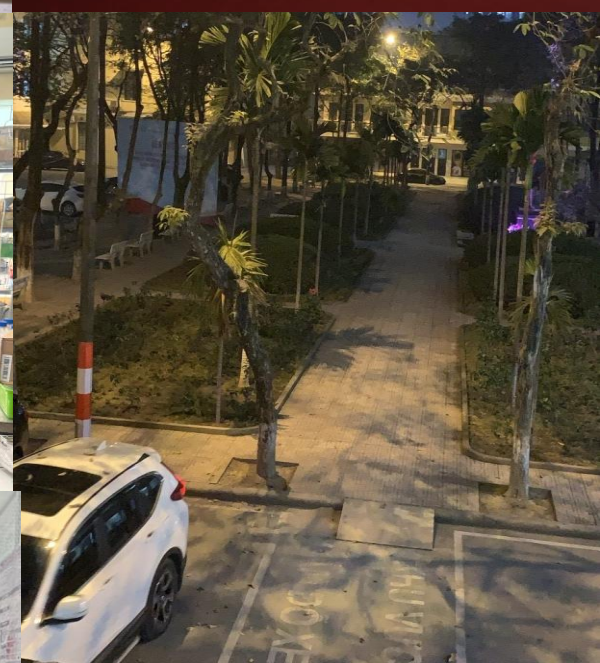
Chuyển thành công gen GFP vào chủng F3 tạo nên hai chủng **G22** và **G26** để khẳng định được sự kích thích sinh trưởng nhờ vi sinh vật đã lây nhiễm là chính xác.

4. Lựa chọn được chủng **F3** và **F5** có hoạt tính sinh **enzyme laccase cao**, làm mất màu thuốc nhuộm xanh methylene, tím kết tinh và có khả năng đóng góp vào quá trình xử lý dioxin trong đất.

KIẾN NGHỊ

1. Từ các chủng đã phân lập được, tiếp tục nghiên cứu, đánh giá các vai trò, chức năng khác để ứng dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.
2. Nghiên cứu áp dụng việc trồng cỏ Vetiver để xử lý ô nhiễm dioxin tại các khu vực khác.

XIN CHÂN THÀNH CẢM ƠN!



**GIẤY MỜI
THAM DỰ HỘI THẢO KHOA HỌC**

Kính gửi:.....

Trường Đại học Thủy lợi trân trọng kính mời Ông/Bà tham dự Hội thảo tháng 10 năm 2024 của nhóm nghiên cứu Research of Organic Matter (ROOM).

- Nội dung:** Đánh giá tồn lưu và nghiên cứu xử lý của một số chất hữu cơ độc bền: trường hợp điển hình về HCBVTV, Dioxin và DDT.
- Thời gian:** 14h00 – 17h00, thứ 7, ngày 26 tháng 10 năm 2024.
- Hình thức hội thảo:** trực tuyến qua phần mềm Zoom ID **9962880601**
- Chủ trì:** Trưởng nhóm ROOM, GS. TS. Vũ Đức Toàn.
- Thành phần mời tham dự:**
Thành phần tham dự và chi tiết chương trình Hội thảo như tại phụ lục đính kèm.

Rất hân hạnh được đón tiếp.

**TL. HIỆU TRƯỞNG
TRƯỞNG PHÒNG
KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ HTQT**

PGS.TS Hồ Sỹ Tâm

Nếu cần thêm thông tin, xin ông/bà liên hệ với PGS.TS Nguyễn Thị Lan Hương – thành viên chủ chốt, điện thoại: 0936149599; email: luongnt@wru.vn

