

## PHÂN LOẠI CHỦNG VI KHUẨN BNA5 ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ ĐẤT BỊ NHIỄM DDT BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ NUCLEOTIT CỦA GIEN 16S-rRNA

NGHIÊM NGỌC MINH, CUNG THỊ NGỌC MAI,  
ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

*Viện Công nghệ sinh học*

Trước đây, trên thế giới cũng như ở Việt Nam, việc phân loại vi sinh vật chủ yếu vẫn dựa vào các đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy, sinh lý, sinh hóa.... Việc phân loại này có nhiều ưu điểm xong cũng bộc lộ 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 ADN. Phương pháp thường được sử dụng trong nghiên cứu phân loại và đa dạng vi sinh vật là dùng các kỹ thuật sinh học 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).... Những kỹ thuật này cũng đã được sử dụng để phát hiện và định tên đến loài các đại diện thuộc chi *Streptomyces* từ môi trường nguyên thủy hoặc đã qua nuôi cấy và cho hiệu quả cao hơn nhiều so với các phương pháp truyền thống [7, 2]. Việc định tên các loài vi sinh vật dựa trên cấu trúc gen 16S rRNA có nhiều thuận lợi, đặc biệt rút ngắn được thời gian nghiên cứu. Gần đây sử dụng kỹ thuật điện di trên gel biến tính nồng độ (DGGE) người ta đã có khả năng nghiên cứu tập đoàn xạ khuẩn trong các mẫu tự nhiên một cách dễ dàng. Điều đó giúp chúng ta hiểu sâu sắc về sự tồn tại của nhóm vi sinh vật này ngay cả khi chúng không có khả năng nuôi cấy [2, 5].

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 nucleotit của gen mã hóa 16S rRNA đã được áp dụng và thu được nhiều kết quả có giá trị [1, 4, 5]. Để phục vụ cho việc giảm thiểu DDT gây ô nhiễm trong đất, tập đoàn vi sinh vật và một số chủng vi

sinh vật tại đây đã được nghiên cứu. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả về phân loại hình thái và phân tử của chủng vi khuẩn BNA5 được phân lập từ vùng đất bị ô nhiễm 1,1,1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethane (DDT) tại khu vực Bắc Trung Bộ, Việt Nam.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn, có ký hiệu là BNA5, được phân lập từ đất bị nhiễm DDT ở khu vực huyện Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An theo phương pháp làm giàu nhiều lần trên môi trường khoáng dịch và được bảo quản trong glyxêrin 75% ở -80°C.

Hóa chất tinh khiết của các hãng Sigma, Invitrogen, Fermentas, Prolabo, Merk. Sử dụng bộ Kit TA cloning<sup>®</sup> Kit của hãng Invitrogen<sup>™</sup>. Các trang thiết bị hiện đại, chính xác thuộc Phòng Công nghệ sinh học môi trường và Phòng thí nghiệm trọng điểm quốc gia về Công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ sinh học.

Cặp mồi 341F (5' - CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3') và 907R (5' - CCG TGA ATT CCT TTT AGT TT - 3') được thiết kế dựa trên trình tự nucleotit của gen mã hóa 16S rRNA của *Escherichia coli* để nhân đoạn gen có kích thước khoảng 550 bp.

#### 2. Phương pháp

a. *Quan sát hình thái của khuẩn lạc và hình thái của tế bào*

Hình thái của khuẩn lạc của chủng BNA5 được quan sát bằng phương pháp cấy gạt trên môi trường hiếu khí tổng số. Hình thái của tế bào của chủng BNA5 được quan sát dưới kính

hiển vi điện tử quét JSML 5410, với sự hợp tác của Viện 69.

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

Tách chiết ADN tổng số của chủng BDN5 theo phương pháp của Sambrook và Russell 2001 [8]. ADN được tinh sạch và tiến hành làm phản ứng PCR với cặp mồi 314F và 907R. Điều kiện của phản ứng PCR được tiến hành như sau: hỗn hợp PCR với tổng thể tích là 25 $\mu$ l gồm: 1  $\mu$ l mồi mỗi loại (20 pmol); 0,5  $\mu$ l hỗn hợp dNTPs (2,5 mM); 2,5  $\mu$ l đệm PCR, 3  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25mM); 0,2  $\mu$ l Taq polymeraza (5 unit/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l ADN tổng số vi khuẩn. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR 9700 với các bước như sau: bước 1: 95°C trong 5 phút; bước 2: 95°C trong 1 phút; bước 3: 55°C trong 1 phút; bước 4: 72°C trong 3 phút; bước 5: lặp lại 30 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; bước 6: 72°C trong 10 phút; bước 7: 4°C trong nhiều giờ (để giữ mẫu). Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarosa nồng độ 0,8%, nhuộm gel bằng étium bromit và quan sát dưới ánh sáng đèn tử ngoại. Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vectơ pCR<sup>tk</sup> 2.1 nhờ enzym T4-DNA ligaza; sản phẩm lai được biến nạp vào chủng *E. coli* INV F' và chọn lọc trên môi trường LB đặc có chứa 50 mg/l ampicillin, 80 mg/l X-Gal, nuôi cấy ở 37°C qua đêm. Tách chiết và làm sạch ADN plasmit theo Sambrook và Russell 2001 [8]. Xác định trình tự nucleotit của gen trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ kit chuẩn BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing. So sánh

trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn BNA5 với các trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rRNA tương ứng tại ngân hàng gen quốc tế EMBL và sử dụng phần mềm Clustal X để xây dựng cây phát sinh chủng loại.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

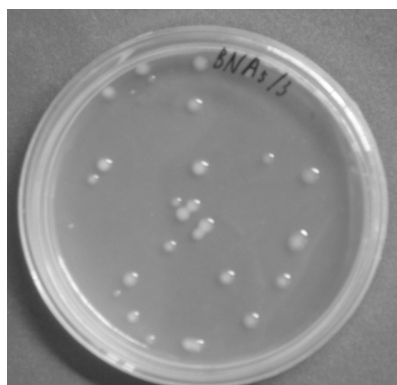
### 1. Phân lập các chủng vi sinh vật từ đất bị nhiễm DDT

Từ nguồn đất bị nhiễm DDT ban đầu, chúng tôi đã tiến hành phân lập và thu nhận được một tập đoàn các vi khuẩn phát triển trên môi trường khoáng có chứa DDT. Sau đó, các loại khuẩn lạc này được làm giàu 3 lần đồng thời trong môi trường khoáng có bổ sung dịch chiết DDT và glucoza 0,1%.

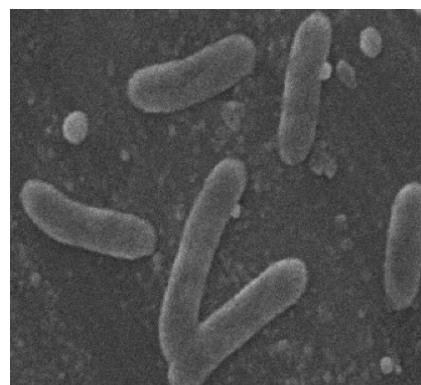
Trong 5 chủng có khả năng phát triển tốt trên môi trường có DDT, chủng BNA5 có khả năng phát triển tốt hơn cả, qua nhiều lần tuyển chọn. Vì vậy, chúng tôi đã chọn chủng BNA5 để tiến hành những nghiên cứu tiếp theo.

### 2. Đặc điểm hình thái và tế bào của chủng vi khuẩn BNA5

Chủng BNA5 có khuẩn lạc hình tròn, bề mặt lồi, trơn, màu trắng đục; đường kính của khuẩn lạc khoảng từ 2-5 mm (hình 1A). Chủng vi khuẩn BNA5 thuộc nhóm vi khuẩn gram dương. Hình dạng tế bào của chủng BNA5 đã được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 15000 lần. Tế bào có dạng hình que ngắn, có kích thước khoảng (1,80-1,87)  $\times$  (0,27-0,53)  $\mu$ m (hình 1B).



A



B

**Hình 1.** Hình dạng của khuẩn lạc (A) và hình thái của tế bào của chủng BNA5 (B)

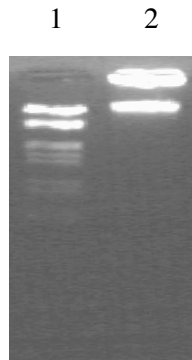
Việc quan sát hình dạng của khuẩn lạc và hình thái của tế bào cho thấy, chủng vi khuẩn BNA5 có nhiều đặc điểm khá giống với những loài thuộc chi *Bacillus*. Để làm rõ vị trí phân loại của chủng này, chúng tôi đã tiến hành phân loại phân tử chủng vi khuẩn BNA5 dựa trên trình tự nucleotit của gen mã hóa 16S rRNA.

### 3. Phân loại dựa trên trình tự nucleotit của gen mã hóa 16S rRNA

Hiện nay, các nhà phân loại vi sinh vật học đã sử dụng rộng rãi kỹ thuật xác định trình tự nucleotit của gen mã hóa 16S rRNA để phân loại vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu trên gen 16S rRNA đã phản ánh khá chính xác vị trí phân loại của các chủng vi khuẩn. Ngoài ra, các dữ liệu về gen tại Ngân hàng gen quốc tế cũng giúp cho việc nghiên cứu về chủng loại phát sinh của chúng một cách dễ dàng và thuận tiện hơn. Để tiến hành phân loại phân tử, chúng tôi đã tách dòng gen 16S rRNA, xác định và so sánh trình tự nucleotit của chủng vi khuẩn BNA5 với các đại diện của prokaryot khác trong Ngân hàng gen quốc tế.

#### a. Tách chiết ADN tổng số

Để tiến hành các nghiên cứu về phân loại phân tử, việc thu được ADN tổng số không bị đứt gãy và đạt độ tinh sạch cao là rất quan trọng. Kết quả tách chiết ADN tổng số được trình bày ở hình 2.



**Hình 2.** Phổ điện di ADN tổng số của chủng BNA5

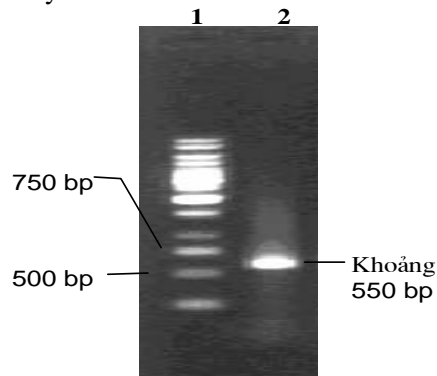
*Ghi chú:* giếng 1. chỉ thị phân tử  $\lambda$  ADN cắt bằng *Hind*III và *E.co*RI; giếng 2. sản phẩm ADN tổng số của BNA5

Kết quả ở hình 2 cho thấy ADN tổng số của chủng vi khuẩn BNA5 không bị đứt gãy, sạch để có thể thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

#### b. Nhân đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn BNA5 bằng kỹ thuật PCR

Để nhân đoạn gen 16S rRNA, chúng tôi sử dụng ADN tổng số của chủng BNA5 làm khuôn, cặp mồi đặc hiệu (314F và 907R) và chu trình nhiệt như đã trình bày ở phần phương pháp. Về mặt lý thuyết một đoạn gen 16S rRNA (khoảng 550 bp) của chủng này sẽ được nhân đoạn bằng kỹ thuật PCR.

Sau phản ứng, sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarosa 1%, và kết quả được trình bày ở hình 3.

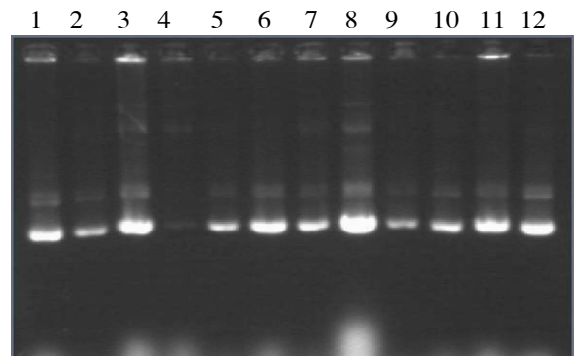


**Hình 3.** Phổ điện di sản phẩm PCR

*Ghi chú:* giếng 1. chỉ thị phân tử 1kb (Fermentas); giếng 2. sản phẩm PCR của chủng BNA5

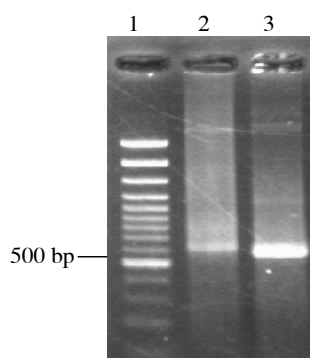
Trên điện di đồ (hình 3), chúng ta có thể thấy sản phẩm PCR nhận được là một băng ADN duy nhất, sắc nét và có kích thước khoảng 550 bp, đúng với kích thước theo như tính toán lý thuyết. Điều này chứng tỏ phản ứng PCR đã nhân khá đặc hiệu đoạn gen 16S rRNA có kích thước mong muốn.

#### c. Tách dòng gen 16S rRNA trong vector pCR 2.1



**Hình 4.** Điện di đồ sản phẩm DNA plasmit

*Ghi chú:* hai giếng 1, 12. đối chứng (vector pCR 2.1); các giếng 2- 11: ADN plasmit của các dòng tế bào từ 1- 10.



**Hình 5.** Phổ điện di sản phẩm PCR

*Ghi chú:* giếng 1. chỉ thị phân tử 100 bp (fermentas); hai giếng 2, 3. sản phẩm PCR ADN plasmit của chủng BNA5 dòng 2 và dòng 7.

Sau khi thu được sản phẩm PCR, chúng tôi đã tiến hành gắn sản phẩm vào vectơ pCR 2.1 nhờ enzym T4 DNA ligaza và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* (chủng INV $\alpha$ F'). Sau khi nuôi tĩnh trong 18 giờ ở 37°C, trên đĩa biến nạp xuất hiện những khuẩn lạc màu trắng xen kẽ với một số khuẩn lạc màu xanh. Một số khuẩn lạc màu trắng đã được chọn lựa để tiến hành tách ADN plasmit. Sản phẩm ADN plasmit thu được ở các dòng tế bào chọn lựa được điện di kiểm tra trên gel agarosa 1%. Kết quả được trình bày ở hình 4. Trên điện di đồ, chúng ta có thể nhận thấy một số mẫu ADN plasmit ở các giếng 2, 3, 5, 6, 7, 9, cao hơn so với mẫu đối chứng là vectơ pCR 2.1 (hai giếng 1, 12). Các ADN plasmit này có kích thước phân tử lớn hơn nên có khả

năng mang sản phẩm mong muốn. Để kiểm tra dòng plasmit được lựa chọn có mang sản phẩm mong muốn hay không, chúng tôi đã tiến hành cắt các dòng plasmit này bằng enzym EcoRI, sau khi điện di thấy một băng đậm, dày có kích thước lớn hơn 250 bp. Theo chúng tôi có thể trong trình tự có điểm cắt nằm ở gần vùng giữa của đoạn gen này nên khó phân tách thành 2 băng riêng biệt trên gel agarosa 1%. Để kiểm tra lại hiện tượng này, các dòng ADN plasmit chọn lọc được dùng làm khuôn và tiến hành PCR lần hai với các điều kiện phản ứng tương tự như đã mô tả ở phần phương pháp. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarosa 1% cho thấy xuất hiện 1 băng có kích thước khoảng hơn 550 bp như đoạn gen nghiên cứu (hình 5). Phổ điện di ở hình 5 cho thấy sản phẩm PCR của chủng BNA5 dòng 7 thể hiện 1 băng sắc nét và có kích thước phân tử hợp lý hơn dòng 2, do vậy chúng tôi quyết định chọn dòng 7 để tách với số lượng lớn để xác định trình tự của chủng BNA5.

*d. Xác định trình tự nucleotit đoạn gen 16S rRNA của chủng BNA5*

ADN plasmit mang đoạn gen có kích thước phân tử mong muốn đã được tách với số lượng lớn và làm sạch để xác định trình tự nucleotit. Trình tự nucleotit đoạn gen 16S rRNA của chủng BNA5 được xác định bằng phương pháp của Sanger, sử dụng cặp mồi M13F và M13R để PCR theo hai chiều. Sau khi phân tích số liệu của trình tự, kết quả được chỉ ra ở hình 6.

TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA  
 AAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA  
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC  
 GCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA  
 ACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG  
 TGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGCGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC  
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCTGCAGCTAACG  
 CATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTG

**Hình 6.** Trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rRNA của chủng BNA5

*Ghi chú:* phần gạch dưới, chữ đậm là vị trí cắt của enzym cắt hạn chế *E. coRI*

Kết quả ở hình 6 cho thấy trình tự nucleotit của đoạn gen nhận được có kích thước 550 bp (hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết).

So sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng BNA5 với các trình tự nucleotit của các vi sinh vật nhân sơ (prokaryote) đã được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế EMBL và phân tích

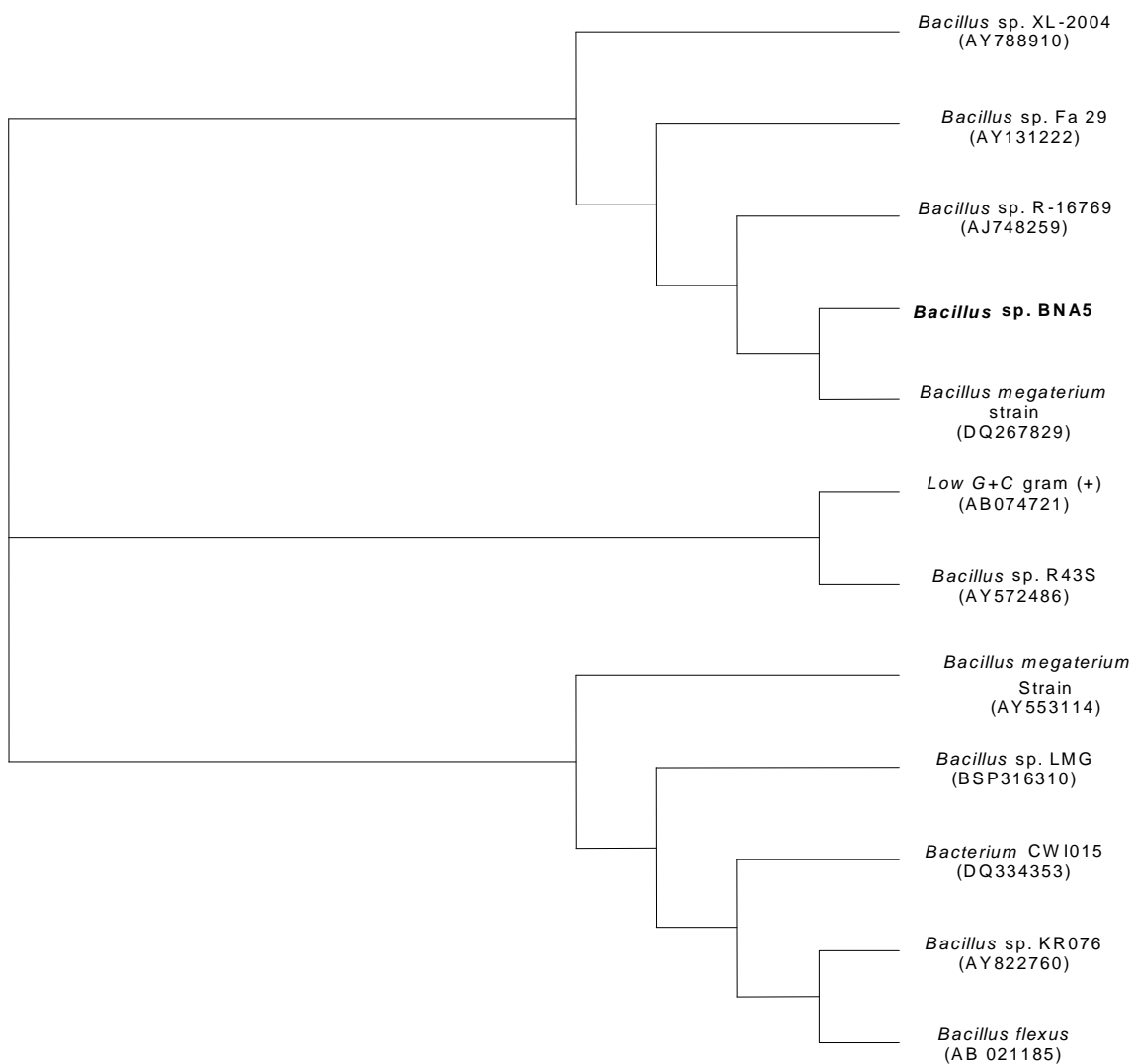
bằng phần mềm Clustal, chúng tôi đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại như ở hình 7.

Trên cây phát sinh chủng loại, chúng ta có thể thấy chủng vi khuẩn BNA5 có quan hệ chặt chẽ với các chủng thuộc chi *Bacillus* và nó có độ tương đồng khá cao (99,83%) với chủng *Bacillus* sp. R-16769 và với loài *Bacillus megaterium* do

vậy chủng BNA5 được xếp vào chi *Bacillus* và tạm được đặt tên là chủng *Bacillus* sp. BNA5. Trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rRNA của chủng này đã được đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế EMBL với mã số AM398158.

Hicks và Corner (1972) đã chứng minh chủng *Bacillus megaterium* có khả năng phân hủy DDT [3], do vậy suy ra chủng *Bacillus* sp.

BNA5 cũng có thể có khả năng sử dụng DDT. Điều này hoàn toàn có thể xảy ra bởi vì địa điểm phân lập được chủng BNA5 là nơi bị ô nhiễm nặng DDT. Tuy nhiên, để khẳng định khả năng sử dụng DDT của chủng *Bacillus* sp. BNA5, cần có thêm các nghiên cứu xác định mức độ chuyển hóa DDT và các gen chức năng tham gia vào quá trình khử độc.



**Hình 7.** Cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. BNA5

### III. KẾT LUẬN

1. Chủng vi khuẩn BNA5 có khuẩn lạc hình tròn, bề mặt lồi, trơn, màu trắng đục; đường kính của khuẩn lạc khoảng từ 2-5 mm. Chủng BNA5 thuộc nhóm vi khuẩn gram dương. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng

đại 15.000 lần, tế bào của chủng BNA5 có dạng hình que ngắn, có kích thước khoảng  $(1,80-1,87) \times (0,27-0,53) \mu\text{m}$ .

2. Kết quả phân loại thông qua việc xác định trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa 16S rRNA cho thấy chủng BNA5 có mối quan hệ

gần gũi với các loài thuộc chi *Bacillus*. Đặc biệt, trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng này có độ tương đồng cao với loài *Bacillus megaterium* (DQ267829) và với chủng *Bacillus* sp. R-16769 (AJ748259), tới 99,83%. Vì vậy, chủng BNA5 tạm được đặt tên là chủng *Bacillus* sp. BNA5. Trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng này đã được đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế EMBL với mã số AM398158.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Thị Cẩm Hà et al.**, 2003: Tạp chí Công nghệ sinh học, 1(3): 377-386.
2. **Heuer H. et al.**, 1997: Appl. Environ. Microbiol., 63: 3233-3241.
3. **Hicks J. R. et al.**, 1972: Location and Consequences of 1,1,1-Trichloro-2,2-bis (p Chlorophenyl) Ethane Uptake by *Bacillus megaterium*: 381-387.
4. **Hoàng Thị Mỹ Hạnh et al.**, 2004: Tạp chí Công nghệ Sinh học, 1(2): 255-264.
5. **Nghiêm Ngọc Minh và Nguyễn Thành Đức**, 2004: Tạp chí Công nghệ sinh học, 2(2): 245-252.
6. **Nghiêm Ngọc Minh**, 2004: Tạp chí Công nghệ sinh học, 2(4): 397-406.
7. **Rintala H. et al.**, 2001: Molecular and Cellular Probes, 15: 337-347.
8. **Sambrook J. and Russell D. W.**, 2001: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

## TAXONOMY OF THE BACTERIAL STRAIN BNA5 ISOLATED FROM DDT CONTAMINATED SOIL BY ANALYSING THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE 16S-rRNA GENE

NGHIEM NGOC MINH, CUNG THI NGOC MAI,  
DANG THI CAM HA

### SUMMARY

The bacterial strain BNA5 was isolated from the DDT contaminated soil of heavy polluted sites. Belonging to positive gram bacteria, this strain had round and smooth colony with 2-5 mm diameter. The cell morphology of the strain BNA5 observed under the Scanning Electron Microscopy (SEM) showed that it was a short rod with 1.80-1.87  $\mu\text{m}$  in length and 0.27-0.53  $\mu\text{m}$  in wide.

In this paper, the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene had been used for taxonomy of the strain BNA5. Results of the amplification of the nucleotide sequence with the primers 314F/907R indicated that the strain BNA5 had high homology with the species of the genus *Bacillus* and was close to the *Bacillus megaterium* strain (DQ267829) and the strain *Bacillus* sp. R-16769 (AJ748259) at 99.83%. Based on the morphology and the 16S rRNA gene nucleotide sequence this strain was classified in the genus *Bacillus* and named *Bacillus* sp. BNA5. The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene (550bp) was of the strain *Bacillus* sp. BNA5 deposited in the EMBL genbank database (with accession number AM398158)

Ngày nhận bài: 11-9-2006