

## NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA BA CHỦNG VI KHUẨN SỬ DỤNG 2,4-D PHÂN LẬP TỪ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN TẠI ĐÀ NẴNG

NGUYỄN BÁ HỮU, ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

*Viện Công nghệ sinh học*

Trong chiến tranh Việt Nam, quân đội Mỹ đã sử dụng lượng lớn chất diệt cỏ chứa dioxin phun rải xuống nhiều nơi ở miền Trung và miền Nam nước ta [8]. Hiện nay, một số căn cứ cũ của Mỹ trước kia trong đó có căn cứ tại sân bay Đà Nẵng vẫn bị ô nhiễm nặng các loại chất độc kể trên. Các phân tích hóa học cho thấy, bên cạnh dioxin (DD), hai thành phần chủ yếu của chất diệt cỏ là 2,4-D và 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) [1]. Công nghệ phân hủy sinh học dựa trên kích thích tập đoàn vi sinh vật bản địa phân hủy các chất ô nhiễm đã và đang thu được kết quả khả quan trong tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại khu vực nhiễm ở sân bay Đà Nẵng [1]. Một số chủng vi sinh vật phân hủy 2,4-D, 2,4,5-T, DD, dibenzofuran và các hợp chất thơm đã được phân lập và nghiên cứu [1], tuy nhiên chưa có nghiên cứu sâu về các gen tham gia quá trình phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T. Trên thế giới phân hủy sinh học và các gen cũng như enzym tham gia phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T đã được quan tâm từ rất sớm, tuy nhiên các nghiên cứu vẫn đang được thực hiện trên chủng vi sinh vật cũng như các mẫu môi trường. Trong nghiên cứu này, ba chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D DNB19, DNB20 và DNB21 được xác định một số đặc điểm về phân loại cũng như gen *cadA* và *tdfA* tham gia chuyển hoá 2,4-D. Các kết quả trong nghiên cứu này sẽ là các cơ sở khoa học để giải thích cho sự thành công khi áp dụng công nghệ phân hủy sinh học để tẩy độc đất nhiễm tại Đà Nẵng.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Chủng vi khuẩn

Ba chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D DNB19, DNB20, DNB21 nhận từ bộ sưu tập giống vi sinh vật của phòng Công nghệ sinh học Môi

trường, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các chủng vi khuẩn này được phân lập từ mẫu nhiễm chất độc hoá học thu thập tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng.

#### 2. Tách chiết ADN tổng số vi khuẩn theo phương pháp sốc nhiệt

Nuôi cấy, thu sinh khối và tách ADN tổng số theo phương pháp đã mô tả trước đây [1].

#### 3. So sánh sự giống nhau giữa các chủng vi khuẩn bằng sử dụng kỹ thuật điểm chỉ BOX-PCR

Phản ứng PCR được tiến hành với mỗi BOX-A1R (5' - CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G - 3') và ADN tổng số của ba chủng vi khuẩn khác nhau. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarosa [6].

#### 4. Định loại vi khuẩn dựa trên cơ sở so sánh trình tự gen mã hoá 16S rRNA

Gen mã hoá 16S rARN của vi khuẩn được nhân lên nhờ kỹ thuật PCR với cặp mồi đa năng 27F và 1492R. Sản phẩm PCR được làm sạch theo kit QIAgen. Trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rARN được xác định trực tiếp trên máy xác định trình tự nucleotit tự động ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer với bộ hoá chất sinh chuẩn BigDye Terminator của Perkin - Elmer và sử dụng các mồi 27F, 530F, 945F, 518R, 1087R và 1492. Trình tự nucleotit được xử lý trên phần mềm Sequencher version 4.0.5. Mức độ tương đồng đoạn gen 16S rARN của các chủng DNB19, DNB20 và DNB21 được so sánh với các trình tự gen 16S rARN trên GenBank và Ribosome Database Project (RDP). Cây phát sinh loài dựa trên sự so sánh trình tự gen 16S rARN được thiết kế dựa trên các phần mềm

Clustal X, Bioedit version 6.0.7, Gendoc, Neibough-Joining (NJ) tree, Mega. Trình tự đoạn gen 16S rARN được đăng ký trên GenBank.

## 5. Xác định gen tham gia vào quá trình phân huỷ 2,4-D

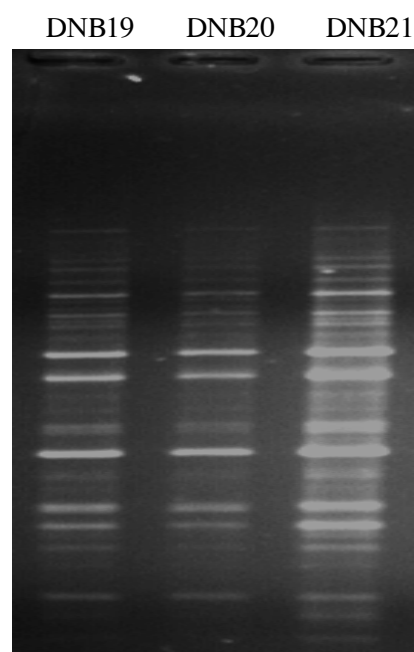
Gen *tfdA* được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp môi *tfdAF* (5'-ACG GAG TTC TGY GAY ATG-3'), *tfdAR* (5'-AAC GCA GCG RTT RTC CCA-3') [10]. Gen *cadA* được nhân lên với cặp môi *cadAF* (5'-AAG CTG CAR TTT GAR AAY GG-3'), *cadAR* (5'-MGG ATT GAA GAA ATC CTG RTA-3') [4]. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarosa, làm sạch với kit QIAgen và xác định trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer với các môi *tfdAF*, *tfdAR*, *cadAF* và *cadAR*. Trình tự các gen *tfdA* và *cadA* và trình tự suy diễn axit amin của các đoạn gen (theo <http://www.expasy.org>) được đăng ký trên Ngân hàng GenBank.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Định loại vi khuẩn

Khuẩn lạc 3 chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D DNB19, DNB20 và DNB21 màu vàng chanh, tuy nhiên giữa các chủng này có sự khác nhau đôi chút về hình dạng khuẩn lạc [1]. Hiện nay, một số kỹ thuật điểm chỉ phân tử (fingerprint) đang được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. Các kỹ thuật này gồm có đa hình chiều dài các đoạn cắt bởi enzym giới hạn (RFLP), phân tích sự cắt rADN nhân được bởi enzym giới hạn (ARDRA), đa hình chiều dài các đoạn cắt bởi enzym giới hạn (PCR có sử dụng môi đánh dấu fluorescent) (T-RFLP), đa hình cấu hình sợi đơn (SSCP), điện di trên gel với dải nồng độ các chất biến tính (DGGE), điện di trên gel với dải nhiệt độ biến tính (TGGE), nhân các đoạn ADN có kích thước khác nhau bằng cách sử dụng môi bổ sung với các trình tự lặp lại (BOX-PCR) [3, 5, 6, 7, 10]. BOX-PCR là kỹ thuật nhanh chóng, tiết kiệm và được sử dụng nhiều để nghiên cứu phân loại hệ thống học số học vi khuẩn trong thực phẩm, y học, môi trường và vi khuẩn liên kết với thực vật [6]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật BOX-PCR được sử dụng để đánh giá sự giống nhau giữa 3 chủng

vi khuẩn DNB19, DNB20 và DNB21. Kết quả ở hình 1 cho thấy 3 chủng trên có các băng ADN giống hệt nhau. Tuy nhiên, để kết luận chính xác mối quan hệ giữa 3 chủng vi khuẩn này, chúng tôi đã tiến hành xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rARN. Trình tự các đoạn gen mã hóa 16S rARN trên được đăng ký trên GenBank với các mã số là EF073264, EF065610 và EF375718. Ba chủng DNB19, DNB20, DNB21 và *Arthrobacter* sp. TM4\_1, *Arthrobacter* sp. TM5\_1 giống hệt nhau về trình tự đoạn gen mã hóa 16S rARN (500 bp) và có quan hệ gần gũi với vi khuẩn khác thuộc chi *Arthrobacter*.

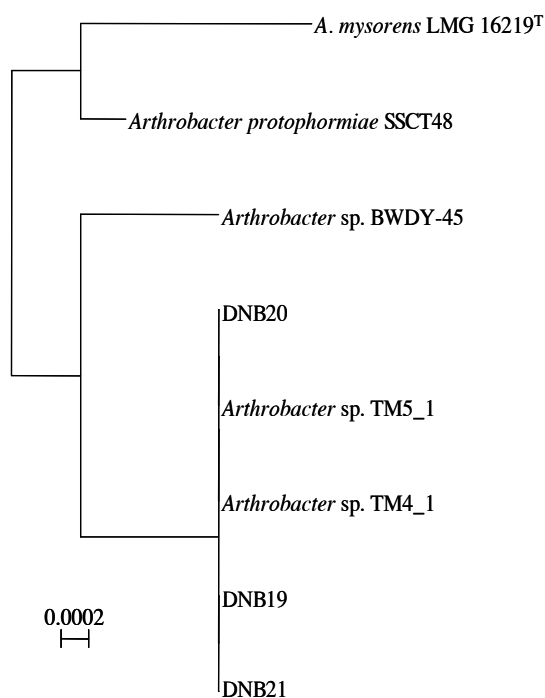


Hình 1. Điện di đồ sản phẩm BOX-PCR

Dựa trên một số đặc điểm hình thái và so sánh trình tự đoạn gen mã hóa 16S rARN cho thấy ba chủng vi khuẩn DNB19, DNB20 và DNB21 thuộc về chi *Arthrobacter* và có các tên là *Arthrobacter* sp. DNB19, *Arthrobacter* sp. DNB20 và *Arthrobacter* sp. DNB21.

Các công bố trước đây [4, 10] cho thấy vi khuẩn phân huỷ 2,4-D thuộc các chi *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodospirillum rubrum* và *Variovorax*, *Bradyrhizobium* và *Sphingomonas*. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen mã hóa 16S rARN cho thấy ba chủng

DNB19, DNB20 và DNB21 thuộc các vi khuẩn phân hủy 2,4-D thường gặp, tuy nhiên chi *Arthrobacter* không phải là chi sử dụng 2,4-D phổ biến trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở Đà Nẵng. Chi *Burkholderia* thuộc lớp Betaproteobacteria là chi vi khuẩn phổ biến trong đất nhiễm tại Đà Nẵng [1].



**Hình 2.** Cây phát sinh chủng loại 3 chủng DNB19, DNB20, DNB21 và một số chủng đại diện chi *Arthrobacter*. Thước đo thể hiện 2 nucleotit khác nhau trên 10000 nucleotit so sánh

## 2. Xác định gen *cadA* và *tfdA* tham gia chuyển hoá 2,4-D

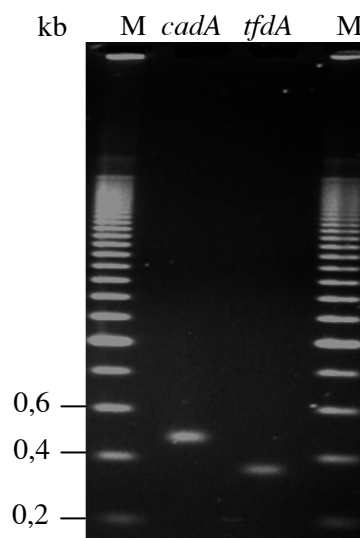
Các vi khuẩn chuyển hoá 2,4-D được xếp chủ yếu vào ba nhóm dựa trên các đặc điểm sinh lý và tiến hoá [4, 9].

- Nhóm thứ nhất là vi khuẩn phú dưỡng thuộc  $\beta$  và  $\gamma$  - proteobacteria, gồm các chi *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodoferrax* và *Variovorax* và đều mang các gen *tfd*. 2,4-D được chuyển hoá sang dạng 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP) bởi enzym  $\alpha$ -ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) 2,4-D dioxygenaza do gen *tfdA* mã hoá. Tiếp theo (2,4-DCP) được hydroxyl

hoá thành 3,5-dichlorocatechol bởi enzym 2,4-DCP hydroxylaza mã hoá bởi gen *tfdB*. Sau đó 3,5-dichlorocatechol được phân huỷ tiếp bởi con đường cắt vòng *ortho* mã hoá bởi *tfdCDEF*.

- Nhóm thứ hai gồm các vi khuẩn  $\alpha$ -proteobacteria phân lập từ đất nguyên thủy, đất trồng trọt ở Nhật Bản và có họ hàng gần với vi khuẩn thuộc chi *Bradyrhizobium*. Mặc dầu các gen phân huỷ 2,4-D chưa được xác định ở các vi khuẩn kể trên, tuy nhiên các gen *cadAB* mã hoá 2,4,5-T oxygenaza ở *Burkholderia cepacia* AC1100 lại được phát hiện ở *Bradyrhizobium* sp. HW13. Gen *tfdA* có mức tương đồng 60% với gen *tfdA* và khi được biểu hiện trong *E. coli* đã có hoạt tính của enzym  $\alpha$  - ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) 2,4-D dioxygenaza.

- Nhóm thứ ba gồm các thành viên của một loài thuộc chi *Sphingomonas* trong  $\alpha$ -proteobacteria. Các vi khuẩn này được phân lập từ các mẫu có nguồn gốc nông nghiệp và công nghiệp. Các gen tham gia phân huỷ 2,4-D trong nhóm này như *tfdBC* giống như ở nhóm thứ nhất, tuy nhiên bước đầu của quá trình oxi hoá 2,4-D không phải enzym  $\alpha$ - ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) 2,4-D dioxygenaza mà là hệ thống enzym khác. Gần đây, sự tồn tại của gen tương tự như *cadA* đã được giả thiết khi kiểm tra bằng kỹ thuật lai phân tử khi sử dụng mẫu dò là gen *cadA* của vi khuẩn *Bradyrhizobium* sp. HW13.



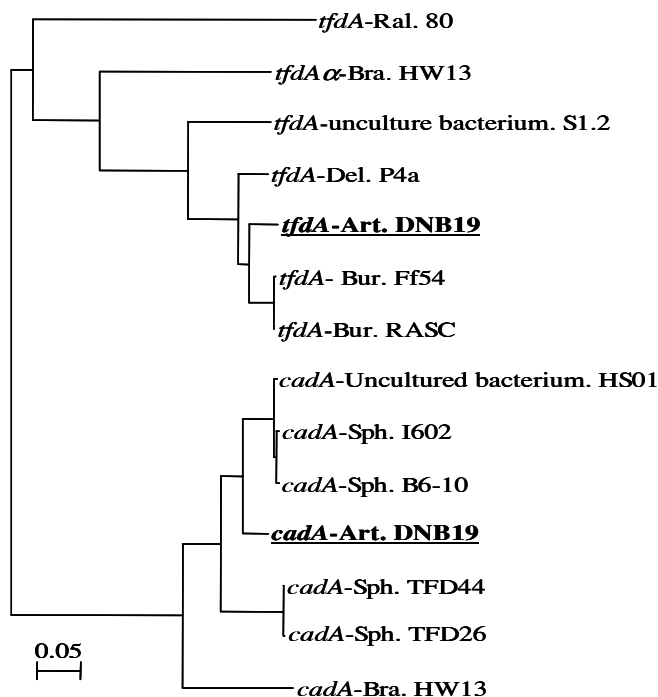
**Hình 3.** Điện di đồ sản phẩm PCR nhân gen *cadA* và *tfdA* từ chủng DNB19. **M.** thang ADN chuẩn 0,2 kb (Promega)

Do ba chủng DNB19, DNB20 và DNB21 giống hệt nhau khi so sánh đoạn gen 16S rARN và sản phẩm BOX-PCR, nên trong nghiên cứu này chủng *Arthrobacter* sp. DNB19 được lựa chọn nghiên cứu sâu về gen *cadA* và *tfdA*. Kết quả ở hình 3 cho thấy, sản phẩm PCR nhân gen *cadA* và *tfdA* từ chủng DNB19 có kích thước như tính toán lý thuyết và được đăng ký trên GenBank với mã số lần lượt là EF375719 và EF375720. Mối quan hệ giữa *cadA* và *tfdA* của chủng *Arthrobacter* sp. DNB19 và các chủng vi khuẩn đại diện được thể hiện ở hình 4.

Trình tự sản phẩm PCR nhân gen *cadA* từ chủng DNB19 có mức tương đồng cao 93% với gen *cadA* của chủng *Sphingomonas* sp. B6-10, dòng HS01 mẫu môi trường; 89% với *cadA* của chủng *Sphingomonas* sp. TFD26; 88% với *cadA* của chủng *Sphingomonas* sp. TFD44, 82% với *cadA* của chủng *Bradyrhizobium* sp. HW13 (hình 4). So sánh trình tự axit amin suy diễn từ sản phẩm nhân gen *cadA* của chủng DNB19 và các chủng kể trên đều cho thấy có mức tương đồng cao, 97% với CadA của *Sphingomonas* sp. B6-10 và dòng HS01 mẫu môi trường; 95% với CadA của *Sphingomonas* sp. TFD26 và 86% với CadA chủng *Bradyrhizobium* sp. HW13. Các

nghiên cứu trước đây mới chỉ phát hiện gen *cadAB* trong các vi khuẩn của chi *Sphingomonas* và *Bradyrhizobium* [4] và có mức tương đồng từ 46-53% với gen *tftAB* mã hoá 2,4,5-T oxygenaza của chủng *Burkholderia cepacia* AC1100 [2, 4]. Trình tự axit amin suy diễn từ đoạn gen *cadA* chủng *Arthrobacter* sp. DNB19 có mức tương đồng 48% với TftA của *Burkholderia cepacia* AC1100. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy sự đa dạng của vi sinh vật chuyển hoá cũng như các gen tham gia vào quá trình phân hủy và khoáng hóa các chất diệt cỏ trong tự nhiên.

Trình tự sản phẩm nhân gen *tfdA* từ chủng DNB19 có mức tương đồng cao, 94% với *tfdA* của các chủng *Burkholderia* sp. RASC, *Burkholderia* sp. Ff54, *Ralstonia* sp. Y103; 91% với *tfdA* của các chủng *Delftia acidovorans* P4a và 77% với *tfdA $\alpha$*  của *Bradyrhizobium* sp. HW13 (hình 4). Trình tự axit amin suy diễn từ sản phẩm nhân gen *tfdA* của chủng DNB19 có mức tương đồng cao, 96% với TfdA của chủng *Burkholderia* sp. RASC, 95% với TfdA chủng *Delftia acidovorans* P4a, 93% với TfdA của chủng *Burkholderia cepacia* 2a.



**Hình 4.** Cây phát sinh chủng loại gen *cadA* và *tfdA* của *Arthrobacter* DNB19 và một số chủng đại diện. Thước đo thể hiện 5 nucleotit khác nhau trên 100 nucleotit so sánh

Các nghiên cứu gần đây mới phát hiện sự tồn tại của cả hai hệ gen *cadAB* và *tfdA $\alpha$*  trong vi khuẩn của hai chi *Sphingomonas* và *Bradyrhizobium* và giả thiết rằng các gen *tftAB* và *tfdA* có nguồn gốc từ *cadAB* và *tfdA $\alpha$*  [4]. Trong nghiên cứu này, hai gen *tfdA* và *cadA* tham gia chuyển hóa 2,4-D đã được tìm thấy ở chủng *Arthrobacter* sp. DNB19 phân hủy 2,4-D. Có thể cả hai gen trên cùng tham gia vào chuyển hóa 2,4-D và gen *cadA* có tham gia vào quá trình chuyển hoá 2,4,5-T hay không? cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn về gen, enzym cũng như các phân tích hóa học về phân hủy sinh học 2,4-D và 2,4,5-T của chủng *Arthrobacter* sp. DNB19.

### III. KẾT LUẬN

Ba chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D phân lập từ bãi đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng giống hệt nhau về đoạn gen mã hóa 16S rARN (500 bp) và so sánh sản phẩm BOX-PCR. Ba chủng trên thuộc chi *Arthrobacter* và được đặt tên là *Arthrobacter* sp. DNB19, *Arthrobacter* sp. DNB20 và *Arthrobacter* sp. DNB21.

Hai gen *cadA* và *tfdA* tham gia chuyển hóa 2,4-D đã được phát hiện ở chủng vi khuẩn *Arthrobacter* sp. DNB19.

Gen *cadA* ở chủng DNB19 có tương đồng cao 93% với gen *cadA* của chủng *Sphingomonas* sp. B6-10, dòng HS01 mẫu môi trường; 89% với *cadA* của chủng *Sphingomonas* sp. TFD26; 88% với *cadA* của chủng *Sphingomonas* sp. TFD44, 82% với *cadA* của chủng *Bradyrhizobium* sp. HW13.

Gen *tfdA* ở chủng DNB19 có mức tương đồng cao, 94% với *tfdA* của các chủng *Burkholderia* sp. RASC, *Burkholderia* sp. Ff54,

*Ralstonia* sp. Y103; 91% với *tfdA* của các chủng *Delftia acidovorans* P4a và 77% với *tfdA $\alpha$*  của *Bradyrhizobium* sp. HW13.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện bởi kinh phí của đề tài cấp nhà nước (Nghiên cứu, phát triển công nghệ phân hủy sinh học và kỹ thuật nhả chậm làm sạch ô nhiễm chất độc hoá học trong đất) thuộc chương trình 33 và quỹ học bổng DAAD (Cộng hoà Liên bang Đức).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Thị Cẩm Hà và cs.**, 2004: Nghiên cứu, phát triển công nghệ phân hủy sinh học và kỹ thuật nhả chậm làm sạch ô nhiễm chất độc hóa học trong đất. Báo cáo nghiệm thu đề tài nhà nước, thuộc chương trình 33. Trung tâm thông tin khoa học và công nghệ Quốc gia. Bộ Khoa học và Công nghệ.
2. **Daubaras D. L. et al.**, 1996: Gene., 179: 1-8.
3. **Hill G. T. et al.**, 2000: Appl. Soil. Ecol., 15: 25-36.
4. **Itoh K. et al.**, 2004: Appl. Environ. Microbiol., 70: 2110-2118.
5. **Kirk J. L. et al.**, 2004: J. Microbiol. Methods, 58: 169-188.
6. **Lanoot B. et al.**, 2004: System. Appl. Microbiol., 27: 84-92.
7. **Schwieger F., Tebbe C. C.**, 1998: Appl. Environ. Microbiol., 64: 4870-4876.
8. **Stellman J. M. et al.**, 2003: Nature, 422: 681-687.
9. **Travkin V. M. et al.**, 1997: FEMS Letters, 407: 69-72.
10. **Vallaey T. et al.**, 1997: FEMS Microbiol., 24: 269-278.

# STUDY OF SOME MOLECULAR BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THREE 2,4-D DEGRADING BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL IN DANANG

NGUYEN BA HUU, DANG THI CAM HA

## SUMMARY

Three 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degrading bacterial strains DNB19, DNB20 and DNB21 isolated from herbicide/dioxin contaminated soil in former military base in Danang were compared by BOX-PCR fingerprint technique and sequence analysis a part of 16S rRNA gene. Although there are few differences on colony morphology, three these strains are identity on sequence 16S rRNA gene (550 bp) as well as ADN patterns of BOX-PCR products. The result of sequence analysis of 16S rRNA genes shown that three strains DNB19, DNB20 and DNB21 had high similar to bacterial strains in genus *Arthrobacter*. Based on the morphological features and 16S rRNA sequence analysis, three strains DNB19, DNB20 and DNB21 should be belong to genus *Arthrobacter* and named as *Arthrobacter* sp. DNB19, *Arthrobacter* sp. DNB20 and *Arthrobacter* sp. DNB21. The strain DNB19 was selected to study the present of *cadA* and *tfdA* genes involved in the first step of 2,4-D degradation pathways. The sequence of a part of *cadA* and CadA hypothetical amino acid in DNB19 shown highest levels to *cadA* (93%) and CadA (97%) from *Sphingomonas* sp. B6-10. The sequence of a part of *tfdA* and TfdA hypothetical amino acid in DNB19 shown highest levels to *tfdA* (94%) from *Burkholderia* sp. RASC, *Burkholderia* sp. Ff54, *Ralstonia* sp. Y103 and TfdA from *Burkholderia* sp. RASC (96%), *Delftia acidovorans* P4a (95%). The sequence of CadA hypothetical amino acid in DNB19 also shown similarity 48% to TfdA from 2,4,5-T degrading bacterium *Burkholderia cepacia* AC1100.

Ngày nhận bài: 27-2-2007