

XÁC ĐỊNH CÁC ĐOẠN GEN MÃ HÓA ENZYME CHUYỂN HÓA CHẤT DIỆT CỎ TỪ BA CHỦNG VI KHUẨN PHÂN HỦY DIBENZOFURAN

Nguyễn Bá Hữu, Đàm Thúy Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Vi khuẩn sử dụng chất diệt cỏ 2,4-D và 2,4,5-T được tìm thấy ở nhiều chi vi khuẩn khác nhau. Nhiều vi khuẩn này cũng đã được phát hiện trong đất ở cả ba miền của Việt Nam, kể cả ở các “điểm nóng” nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin (DCD) ở căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng. Các đoạn gen *tfdA*, *tfdAα* và *cadA* cũng đã được phát hiện trong các chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T cũng như trong DNA tách trực tiếp từ đất tại “điểm nóng” ở Đà Nẵng. Hiện chưa có nghiên cứu nào về quá trình chuyển các gen kể trên trong các vi sinh vật đất tại Đà Nẵng. Trong nghiên cứu này, các đoạn gen *tfdA*, *tfdAα* và giống *cadA* đã được phát hiện trong ba chủng vi khuẩn sử dụng dibenzofuran *Rhodococcus* sp. HDN3, *Paenibacillus* sp. Ao3 và *Terrabacter* sp. DMA phân lập từ đất và trầm tích nhiễm DCD ở Đà Nẵng. Đoạn gen *tfdA* của hai chủng Ao3 và DMA có mức tương đồng cao 98% với trình tự *tfdA* trong plasmid pJP4 của chủng *Ralstonia eutropha* JMP134 và mức tương đồng cao với đoạn gen này ở một số chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D cũng như DNA phân lập từ đất ở Việt Nam. Đoạn gen *tfdA* ở chủng vi khuẩn HDN3 có mức tương đồng cao 99% với đoạn gen tương tự ở các vi khuẩn sử dụng 2,4-D như *Burkholderia* sp. RASC và *Burkholderia* sp. Ff54. Trình tự đoạn gen giống *cadA* ở hai chủng Ao3 và DMA có độ tương đồng cao với trình tự đoạn gen giống *cadA* dòng HS07 từ DNA mẫu bùn hoạt tính có bổ sung 2,4-D, mức tương đồng lần lượt là 99 và 86%.

Từ khóa: *cadA*, dibenzofuran, dioxin, phân hủy sinh học, *tfdA*, 2,4-D, 2,4,5-T

ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất diệt cỏ 2,4-D và 2,4,5-T chứa dioxin được quân đội Mỹ sử dụng trong chiến tranh Việt Nam và để lại những hậu quả nghiêm trọng cho môi trường tự nhiên và con người. Hiện nay, một số căn cứ quân sự cũ trước kia của Mỹ trong đó có căn cứ tại sân bay Đà Nẵng vẫn bị ô nhiễm nặng các loại chất diệt cỏ chứa dioxin. 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 DCD tại khu vực nhiễm ở sân bay Đà Nẵng (Nguyễn Thanh Thủy *et al.*, 2008). Các vi khuẩn sử dụng 2,4-D được biết đến thuộc các chi *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodospirillum rubrum*, *Variovorax*, *Bradyrhizobium* và *Sphingomonas* (Vallaey *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2004, Nguyen *et al.*, 2007).

Trên thế giới, các gen cũng như enzyme tham gia phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T đã được quan tâm từ rất sớm. Bước đầu tiên của quá trình chuyển hóa sinh học 2,4-D thành 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) được

thực hiện bởi 2,4-D/ α -ketoglutarate dioxygenase (TfdA) và các enzyme này được mã hóa bởi các gen *tfdA* trong các vi khuẩn thuộc β và γ -*Proteobacteria* và *tfdAα* trong các vi khuẩn thuộc α -*Proteobacteria* (Itoh *et al.*, 2004). Giai đoạn đầu tiên của phân hủy sinh học 2,4,5-T dường như là giống 2,4-D, bởi vì 2,4,5-T được cắt để sinh ra 2,4,5-trichlorophenol (2,4,5-TCP) và glyoxylate (Daubaras *et al.*, 1996). Tuy nhiên, tương phản với TfdA, enzyme xúc tác sự chuyển hóa này của 2,4,5-T là một monooxygenase được mã hóa bởi các gen *tftA* và *tftB*. Kitagawa và đồng tác giả (2002) công bố về các gen mã hóa 2,4-D monooxygenase trong chủng *Bradyrhizobium* sp. HW13 phân hủy 2,4-D. Các tế bào nghỉ của chủng vi khuẩn này chuyển hóa 2,4-D, thậm chí 2,4,5-T và phenoxyacetate đến các phenol tương ứng. Chủng này chứa một cụm gen *cadRABKC* và các gen *cadAB* có sự giống nhau đáng kể với các gen *tftAB* của *B. cepacia* AC1100.

Ở Việt Nam, một số chủng vi sinh vật phân hủy 2,4-D, 2,4,5-T, dioxin, dibenzofuran đã được phân lập (Nguyễn Thanh Thủy *et al.*, 2008; Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007a; d). Mặc dù vậy, nghiên cứu sâu về các gen tham gia quá trình phân

hủy 2,4-D và 2,4,5-T cũng như sự chuyển gen trong tập đoàn vi sinh vật chưa nhiều. Ba chủng vi khuẩn sử dụng dibenzofuran *Paenibacillus* sp. Ao3, *Terrabacter* sp. DMA và *Rhodococcus* sp. HDN3 được phân lập từ đất và trầm tích tại bãi nhiễm DCD tại Đà Nẵng. Tuy nhiên, hiện chưa có công bố nào về khả năng phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T của các chủng thuộc các chi *Paenibacillus*, *Terrabacter* và có ít tài liệu về sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T của các chủng thuộc chi *Rhodococcus*. Trong nghiên cứu này, sự tồn tại của các đoạn gen *tfdA*, *tfdA α* và giống *cadA* tham gia bước đầu tiên của chuyển hóa chất diệt cỏ trong ba chủng vi khuẩn sử dụng dibenzofuran *Rhodococcus* sp. HDN3, *Paenibacillus* sp. Ao3 và *Terrabacter* sp. DMA đã được xác định. Các kết quả trong công trình này sẽ cung cấp thêm 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.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi khuẩn

Ba chủng vi khuẩn sử dụng dibenzofuran *Rhodococcus* sp. HDN3, *Paenibacillus* sp. Ao3 và *Terrabacter* sp. DMA và không sử dụng 2,4-D và 2,4,5-T đã được phân lập từ mẫu nhiễm chất DCD thu thập tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007b; d).

Xác định gen tham gia vào bước đầu của quá trình phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T

Nuôi cấy, thu sinh khối và tách DNA tổng số theo phương pháp đã mô tả trước đây (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007c). Các đoạn gen *cadA*, *tfdA* được nhân lên từ DNA tổng số của 3 chủng DMA, Ao3 và HDN3 với các cặp mồi *tfdA α F*, *tfdA α R* (Itoh *et al.*, 2002); *tfdAF* và *tfdAR* (Vallaey *et al.*, 1997); *cadAF*, *cadAR* (Kitagawa *et al.*, 2002). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose, làm sạch với kit QIAgen và xác định trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer với các mồi *tfdA α F*, *tfdA α R*, *cadAF* và *cadAR*. Trình tự gen *tfdA*, gen giống *cadA* và trình tự suy diễn amino acid của các đoạn gen này (<http://www.expasy.org>) được đăng ký trên GenBank. Cây phát sinh loài dựa trên sự so sánh trình tự các gen *tfdA* và *cadA* được thiết kế dựa trên các phần mềm Clustal X, Bioedit version 6.0.7, Gendoc, Neibough-Joining (NJ) tree.

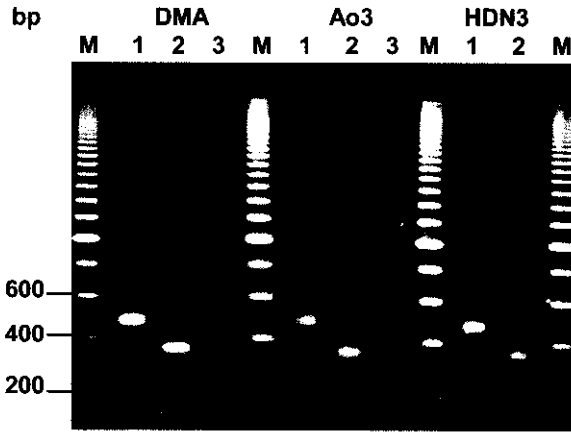
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân đoạn gen *tfdA* và đoạn gen giống *cadA*, từ ba chủng vi khuẩn

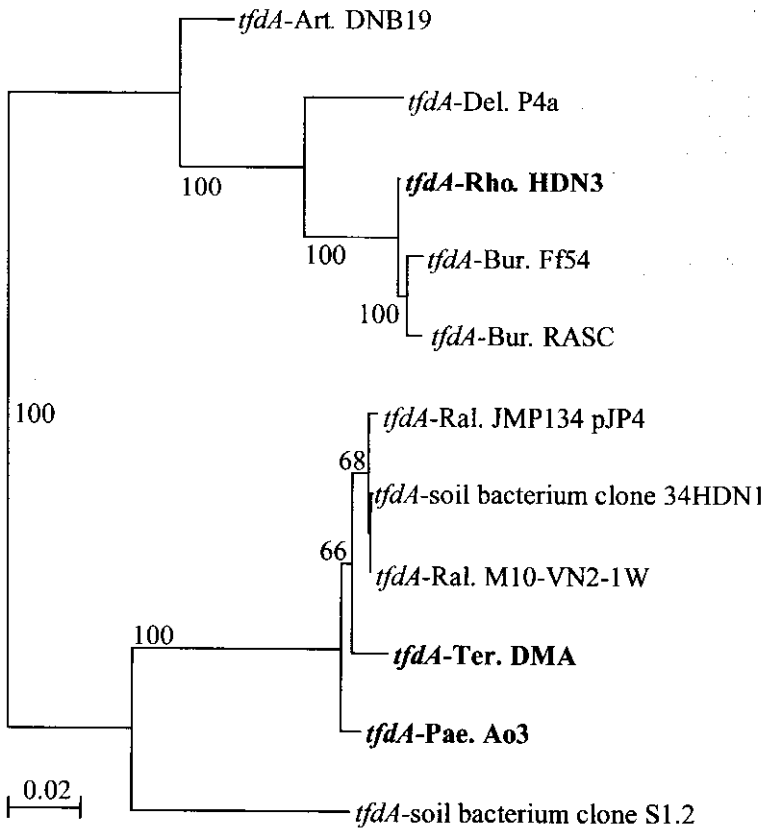
Kết quả ở hình 1 cho thấy, sản phẩm PCR nhân các đoạn gen *cadA*, *tfdA* (với cặp mồi *tfdA α F* và *tfdA α R*) từ ba chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. HDN3, *Paenibacillus* sp. Ao3 và *Terrabacter* sp. DMA rất đặc hiệu. Tuy nhiên, sản phẩm nhân đoạn gen *tfdA* (với cặp mồi *tfdAF* và *tfdAR*) từ hai chủng *Paenibacillus* sp. Ao3 và *Terrabacter* sp. DMA rất ít (Hình 1), và chưa thu được sản phẩm nhân đoạn gen này từ chủng *Rhodococcus* sp. HDN3. Sản phẩm PCR nhân hai đoạn gen *tfdA* với hai loại cặp mồi kể trên đều có kích thước tương tự nhau, theo lý thuyết đoạn gen này có kích thước 357 bp. Tuy nhiên, cặp mồi *tfdA α F* và *tfdA α R* được Itoh và đồng tác giả thiết kế để nhân được đoạn gen *tfdA* từ các chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D trong đó có chi *Bradyrhizobium* thuộc nhóm α -*Proteobacteria* (Itoh *et al.*, 2002). Theo tính toán lý thuyết sản phẩm PCR nhân đoạn gen *cadA* có kích thước 435 bp.

Vi khuẩn phân hủy 2,4-D được nghiên cứu nhiều nhất đó là *Ralstonia eutropha* JMP134 (tên cũ *Alcaligenes eutropha* JMP134). Đầu tiên, 2,4-D được vi khuẩn này chuyển hóa sang dạng 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) nhờ enzyme TfdA mã hóa bởi gen *tfdA* nằm trên plasmid pJP4 (Travkin *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2004).

Gen *tfdA* thuộc nhóm vi khuẩn có họ hàng gần với chi *Bradyrhizobium* lớp α -*Proteobacteria*, còn được gọi là *tfdA α* . Gen *tfdA α* có mức tương đồng 60% với gen *tfdA* và khi được biểu hiện trong *E. coli* đã có hoạt tính của enzyme TfdA. Các gen *tfdA α* và *cadA* gen mã hóa các enzyme phân hủy 2,4-D đã được xác định ở các vi khuẩn phân hủy 2,4-D thuộc chi *Bradyrhizobium* (Itoh *et al.*, 2004). Ngoài ra, các gen *cadAB* mã hóa 2,4,5-T oxygenase ở *Burkholderia cepacia* AC1100 lại được phát hiện ở *Bradyrhizobium* sp. HW13. Các nhà khoa học cũng đã phát hiện khả năng chuyển hóa 2,4-D của một loài thuộc chi *Sphingomonas* trong α -*Proteobacteria*. Các gen tham gia phân hủy 2,4-D trong nhóm này như *tfdB* giống như ở *R. eutropha* JMP134, tuy nhiên bước đầu của quá trình oxy hóa 2,4-D không phải enzyme TfdA mà là hệ thống enzyme khác. Gần đây, các nhà nghiên cứu cũng giả thiết sự tồn tại của gen tương tự như *cadA* khi kiểm tra bằng kỹ thuật lai phân tử sử dụng mẫu dò là gen *cadA* của vi khuẩn *Bradyrhizobium* sp. HW13 (Itoh *et al.*, 2004).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân đoạn gen giống *cadA* và *tfdA* từ 3 chủng DMA, Ao3 và HDN3. M: thang DNA chuẩn 0,2 kb, 1: *cadA*, 2-*tfdA* α (cặp mồi *tfdA* α F và *tfdA* α R), 3: *tfdA* (cặp mồi *tfdA*F và *tfdA*R).



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại gen *tfdA* của 3 chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. Ao3, *Terrabacter* sp. DMA, *Rhodococcus* sp. HDN3 và một số chủng đại diện. Thước đo thể hiện 2 nucleotide khác nhau trên 100 nucleotide so sánh.

Xác định và phân tích trình tự đoạn gen *tfdA*

Trong nghiên cứu này, trình tự các đoạn gen *tfdA* (với cặp môi *tfdA α F* và *tfdA α R*) và trình tự amino acid suy diễn của các đoạn gen này thu nhận từ ba chủng DMA, HDN3 và Ao3 đã được xác định và đăng ký trên GenBank với mã số lần lượt là EU372721, EU372722, EU373723 và ACB30158.1, ACB30159.1, ACB30160.1

Kết quả ở hình 2 cho thấy, đoạn gen *tfdA* ở hai chủng Ao3 và DMA có mức tương đồng cao với gen *tfdA* lớp I của các vi khuẩn sử dụng 2,4-D trong đó có *R. eutropha* JMP134 (Don, Pemberton, 1981; Ka, Tiedje, 1994). Đoạn gen *tfdA* của hai chủng Ao3 và DMA có mức tương đồng cao 98% với trình tự *tfdA* trong plasmid pJP4 của chủng *R. eutropha* JMP134 (354/361 nucleotide so sánh). Ngoài ra, đoạn gen *tfdA* ở chủng Ao3 và DMA cũng có mức tương đồng cao với đoạn gen này từ DNA phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở Việt Nam và từ một số chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D phân lập từ đất ở Việt Nam (Nguyen *et al.*, 2007, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007a).

Khác với đoạn gen *tfdA* ở hai chủng Ao3 và DMA, đoạn gen này ở chủng vi khuẩn HDN3 có mức tương đồng cao với đoạn gen tương tự *tfdA* lớp II ở các vi khuẩn sử dụng 2,4-D. Đoạn gen *tfdA* ở các chủng *Rhodococcus* sp. HDN3, *Burkholderia* sp. RASC và *Burkholderia* sp. Ff54 có mức tương đồng 99% (353/354 nucleotide so sánh). Ngoài ra đoạn gen này ở chủng *Rhodococcus* sp. HDN3 có mức tương đồng thấp hơn với gen *tfdA* ở các chủng vi khuẩn *Arthrobacter* sp. DNB19 (90%) và *Delftia* sp. 4a (92%).

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn đoạn gen *tfdA* ở ba chủng DMA, HDN3, Ao3 và các trình tự amino acid của các TfdA bằng chương trình Blast cho thấy có mức tương đồng rất cao. Trình tự amino acid suy diễn đoạn gen *tfdA* ở chủng DMA có mức tương đồng 97% (108/111 amino acid so sánh) với TfdA của chủng *R. eutropha* JMP134, 96% (107/111 amino acid so sánh) với TfdA của hai chủng *Ralstonia* sp. 80 và *Burkholderia* sp. 54, 100% (110 amino acid) với TfdA từ một số dòng thu nhận từ DNA tổng số các mẫu đất nhiễm CDC tại Đà Nẵng và 96% (96/99 amino acid so sánh) với 2,4-D dioxygenase từ một số chủng vi khuẩn sử dụng chất diệt cỏ phân lập tại một số điểm khác nhau ở Việt Nam. Trình tự amino acid suy diễn đoạn gen *tfdA* ở chủng HDN3 có mức tương đồng 99% (117/118 amino acid so sánh) với TfdA của chủng

Burkholderia sp. RASC và một số dòng thu nhận từ DNA tổng số các mẫu đất nhiễm CDC tại Đà Nẵng, 96% (114/118 amino acid so sánh) với TfdA của hai chủng *Delftia acidovorans* P4a và 94% (112/118 amino acid so sánh) với TfdA của chủng *Burkholderia cepacia* 2a. Trình tự amino acid suy diễn đoạn gen *tfdA* ở chủng DMA có mức tương đồng 98% (119/121 amino acid so sánh) với TfdA của chủng *R. eutropha* JMP134, 97% (118/121 amino acid so sánh) với TfdA của chủng *Achromobacter xylosoxidans* TFD9, 99% (117/118 amino acid so sánh), 98% (102/104 amino acid so sánh) với 2,4-D dioxygenase từ một số chủng vi khuẩn sử dụng chất diệt cỏ phân lập tại một số điểm khác nhau ở Việt Nam.

Xác định và phân tích trình tự đoạn gen giống *cadA*

Trình tự đoạn gen giống *cadA* và trình tự amino acid suy diễn của gen này ở hai chủng *Paenibacillus* sp. Ao3 và *Terrabacter* sp. DMA đã được xác định và đăng ký trên GenBank với mã số lần lượt là EU372719, EU372720 và ACB30156.1, ACB30157.1.

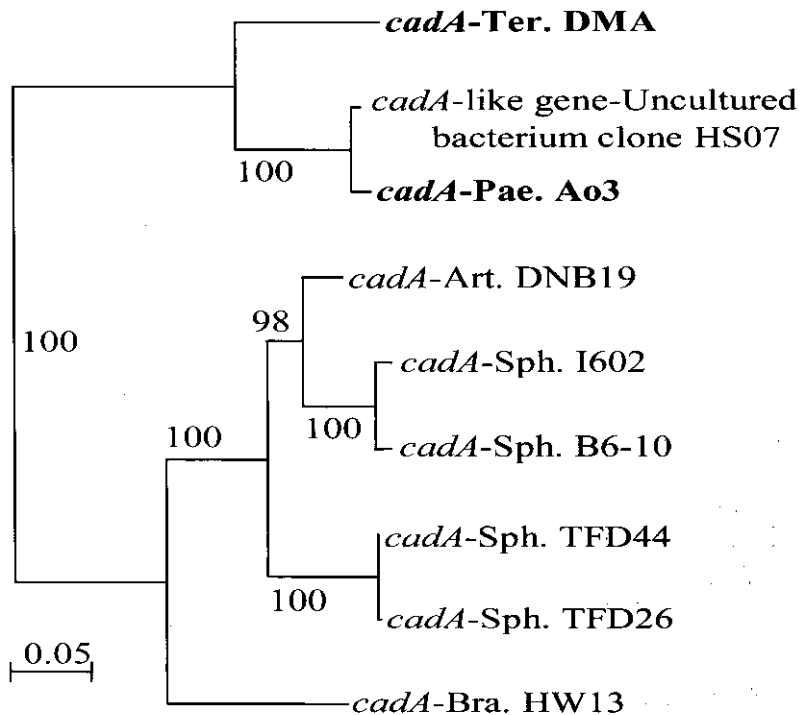
So sánh trình tự nucleotide đoạn gen giống *cadA* ở hai chủng Ao3 và DMA cho thấy, chúng chỉ tương đồng cao với trình tự đoạn gen giống *cadA* dòng HS07 từ DNA mẫu bùn hoạt tính có bổ sung 2,4-D, mức tương đồng lần lượt là 99 và 86%. Tuy nhiên, trình tự amino acid suy diễn từ trình tự đoạn gen giống *cadA* ở hai chủng Ao3 và DMA có mức tương đồng với một số trình tự amino acid các gen *cadA*, giống *cadA*, *tftA* ở một số chủng vi khuẩn *Bradyrhizobium* và vi khuẩn khác trong đó có *B. cepacia* AC1100. Mức tương đồng trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen giống *cadA*, *tftA* ở hai chủng Ao3, DMA và hai chủng đại diện *Bradyrhizobium* sp. HW13, *B. cepacia* AC1100 lần lượt là 54, 43, 51 và 37%.

Các nghiên cứu trước đây mới chỉ phát hiện gen *cadAB* trong các vi khuẩn của chi *Arthrobacter*, *Sphingomonas* và *Bradyrhizobium* (Itoh *et al.*, 2004) và có mức tương đồng từ 46 - 53% với gen *tftAB* mã hóa 2,4,5-T oxygenase của chủng *B. cepacia* AC1100 (Daubaras *et al.*, 1996, Itoh *et al.*, 2004). Trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen giống *cadA* chủng *Paenibacillus* sp. Ao3 có mức tương đồng 51% với TftA của *B. cepacia* AC1100.

Nghiên cứu gần đây đã phát hiện sự tồn tại của cả hai hệ gen *cadAB* và *tfdA α* trong vi khuẩn của hai

chi *Sphingomonas* và *Bradyrhizobium* (Itoh *et al.*, 2004). Trong nghiên cứu này, gen *tfdA* và gen giống *cadA* có mặt trong cả 3 chủng vi khuẩn sử dụng dibenzofuran *Paenibacillus* sp. Ao3, *Terrabacter* sp.

DMA và *Rhodococcus* sp. HDN3. Như vậy, kết quả trong nghiên cứu này cho thấy sự đa dạng của vi sinh vật cũng như các gen tham gia vào quá trình phân hủy và khoáng hóa các chất diệt cỏ trong tự nhiên.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại gen giống *cadA* của 2 chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. Ao3, *Terrabacter* sp. DMA và một số chủng đại diện. Thước đo thể hiện 5 nucleotide khác nhau trên 100 nucleotide so sánh.

Các gen *tfdA* lớp I thường nằm trên các plasmid có thể được chuyển cho nhiều tế bào chủ (Don, Pemberton, 1981; Ka, Tiedje, 1994). Trong khi đó, gen *tfdA* lớp II của chủng *Burkholderia* sp. RASC nằm trên nhiễm sắc thể (Suwa *et al.*, 1996), gen *tfdA* lớp III có mặt trong plasmid pEST4011 của vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* EST4002 (Vedler *et al.*, 2000) hoặc trong pIJB1 của *Delftia* sp. 2a và *Delftia* sp. P4a (Poh *et al.*, 2002). Trong hệ sinh thái đất, quá trình chuyển gen giữa các sinh vật đóng vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất, đặc biệt sự chuyển gen tham gia quá trình phân hủy và khoáng hóa các chất độc hại có nguồn gốc từ hoạt động sản xuất của con người. Các chất diệt cỏ 2,4-D, 2,4,5-T được đưa vào sử dụng từ gần 70 năm qua và nhiều nghiên cứu đã chứng minh được quá trình chuyển gen phân hủy 2,4-D trong tự

nhiên giữa các vi sinh vật có khả năng sử dụng 2,4-D sang các vi sinh vật đất bình thường khác (Digiovanni *et al.*, 1996, McGowan *et al.*, 1998, de Liphay *et al.*, 2001). Hogan và đồng tác giả (1997) đã sử dụng kỹ thuật PCR điều tra sự phân bố của gen *tfdA* trong các vi khuẩn đất trong đó có vi khuẩn không phân hủy 2,4-D. 37% trong số 76 vi khuẩn kiểm tra có mang *tfdA* và không có chủng nào trong số này có khả năng phân hủy 2,4-D. Các vi khuẩn mang *tfdA* thuộc các nhóm vi khuẩn α , β và γ -*Proteobacteria* và *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* subdivision và các vi khuẩn có tỷ lệ G+C cao trong ngành vi khuẩn Gram dương. Các tác giả đã giả thiết rằng, *tfdA* hoặc các gen có mức tương đồng cao phân bố rộng rãi trong các chủng vi khuẩn đất và tồn tại trong các vi khuẩn này với mục đích khác chứ không phải phân hủy 2,4-D (Hogan *et al.*, 1997).

Sự tồn tại của gen *tfda* và gen giống *cadA* ở ba chủng vi khuẩn sử dụng dienzofuran *Paenibacillus* sp. Ao3, *Terrabacter* sp. DMA và *Rhodococcus* sp. HDN3 cho thấy có thể trong môi trường đất và trầm tích ô nhiễm DCD vẫn xảy ra quá trình trao đổi vật liệu di truyền giữa các vi khuẩn sử dụng DCD và các vi khuẩn không sử dụng DCD. Quá trình trao đổi các gen tham gia chuyển hóa chất diệt cỏ có ý nghĩa quan trọng trong quá trình phân hủy sinh học chất diệt cỏ ở môi trường tự nhiên. Tuy nhiên, cần có thêm các bằng chứng về sinh học phân tử để kiểm chứng giả thiết trên, vai trò của các gen này trong các vi sinh vật kể trên.

KẾT LUẬN

Các đoạn gen *tfda* và gen giống *cadA* đã được phát hiện trong ba chủng vi khuẩn sử dụng dibenzofuran *Paenibacillus* sp. Ao3, *Terrabacter* sp. DMA và *Rhodococcus* sp. HDN3 phân lập được từ đất và trầm tích nhiễm DCD tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở Đà Nẵng.

Đoạn gen *tfda* của hai chủng Ao3 và DMA có mức tương đồng cao 98% với trình tự đoạn gen *tfda* trong plasmid pJP4 của chủng *R. eutropha* JMP134 và mức tương đồng cao với đoạn gen này ở một số chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D cũng như DNA phân lập từ đất ở Việt Nam. Đoạn gen *tfda* ở chủng vi khuẩn HDN3 có mức tương đồng cao 99% với đoạn gen tương tự ở các vi khuẩn sử dụng 2,4-D như *Burkholderia* sp. RASC và *Burkholderia* sp. Ff54.

Trình tự đoạn gen giống *cadA* ở hai chủng Ao3 và DMA có độ tương đồng cao với trình tự đoạn gen giống *cadA* dòng HS07 từ DNA mẫu bùn hoạt tính có bổ sung 2,4-D, mức tương đồng lần lượt là 99 và 86%. Mức tương đồng trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen giống *cadA*, *tftA* ở hai chủng Ao3, DMA và hai chủng đại diện *Bradyrhizobium* sp. HW13, *B. cepacia* AC1100 lần lượt là 54, 43, 51 và 37%.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài độc lập cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Nghiên cứu xử lý tẩy độc một số hợp chất hữu cơ chứa clo bằng các phương pháp hóa học, sinh học tiên tiến) và Quỹ học bổng DAAD (Cộng hòa Liên bang Đức).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Daubaras DL, Danganan CE, Hubner A, Ye RW,

Hendrickson W, Chakrabarty AM (1996) Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: evolutionary insight. *Gene* 179: 1-8.

de Liphthay JR, Barkay T, Sorensen SJ (2001) Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfda* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic dioxygenase. *FEMS Microbiol Ecol* 35: 75-84.

Digiovanni GD, Neilson JW, Pepper IL, Sinclair NA (1996) Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Appl Environ Microbiol* 62(7): 25221-2526.

Don RH, Pemberton JM (1981) Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 145: 681-686.

Hogan DA, Buckley DH, Nakatsu CH, Schmidt TM, Hausinger RP (1997) Distribution of the *tfda* gene in soil bacteria that do degrade 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Microbiol Ecol* 97: 90-96.

Itoh K, Kanda R, Sumita Y, Kim H, Kamagata Y, Suyama K, Yamamoto H, Hausinger RP, Tiedje JM (2002) *tfda*-like genes in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria belonging to the *Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia* cluster in α -Proteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 68: 3449-3454.

Itoh K, Tashiro Y, Uobe K, Kamagata Y, Suyama K, Yamamoto H (2004) Root nodule *Bradyrhizobium* spp. harbor *tfda* α and *cadA*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Appl Environ Microbiol* 70: 2110-2118.

Ka JO, Tiedje JM (1994) Integration and excision of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its natural intergeneric transfer. *J Bacteriol* 176: 5284-5289.

Kitagawa W, Takami S, Miyauchi K, Masai E, Kamagata Y, Tiedje JM, Fukuda M (2002) Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp strain HW13 isolated from a pristine environment. *J Bacteriol* 184: 509-518.

McGowan C, Fulthorpe R, Wright A, Tiedje JM (1998) Evidence for interspecies gene transfer in the evolution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrader. *Appl Environ Microbiol* 64(10): 4089-4092.

Nguyen LH, Itoh K, Suyama K (2007) Diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading

bacteria in Vietnamese soils. *Microb Environ* 22(3): 243-256.

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2007a) 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. *Tạp chí Sinh học* 29(4): 80-85.

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2007b) Xác định gen mã hóa dioxygenaza từ chủng xạ khuẩn phân hủy dibenzofuran *Rhodococcus* sp. HDN3 phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng. *Tạp chí khoa học và công nghệ* 45(2): 61-67.

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2007c) Xác định gen mã hóa dioxygenaza từ chủng vi khuẩn phân hủy dibenzofuran *Terrabacter* sp. DMA phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng. *Tạp chí Sinh học* 29(3): 83-89.

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2007d) Xác định gen mã hóa dioxygenase của chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. Ao3 phân hủy dibenzofuran phân lập từ bùn ao thuộc khu đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(3): 391-396.

Nguyễn Thanh Thùy, Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Vũ Xuân Đạt, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà (2008) Phân loại và khả năng phân hủy chất diệt cỏ 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid của chủng nấm sợi FDN41

phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(1): 119-126.

Poh R, Xia X, Bruce IJ, Smith ARW (2002) 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia cepacia* strain 2a and *Ralstonia eutropha* JMP134. *Microbiol* 105: 43-63.

Suwa Y, Wright AD, Fukumori F, Nummy KA, Hausinger RP, Holben WE, Forney LJ (1996) Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. *Appl Environ Microbiol* 62: 2464-2469.

Travkin VM, Jadan AP, Briganti F, Scotzzafava A, Golovleva LA (1997) Characterisation of an intradiol dioxygenase involved in the biodegradation of the chlorophenoxy herbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *FEMS Letters* 407: 69-72.

Vallaeyts T, Persello-Cartieaux F, Rouard N, Lors C, Laguerre G, Soulas G (1997) PCR-RFLP analysis of 16S rRNA, *tfdA* and *tfdB* genes reveals a diversity of 2,4-D degraders in soil aggregates. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 269-278.

Vedler E, Koiv V, Heinaru A (2000) Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp *denitrificans* strain EST4002. *Gene* 255: 281-288.

CHARACTERISATION OF GENE FRAGMENTS ENCODED HERBICIDE METABOLIZING ENZYMES FROM THREE DIBENZOFURAN-DEGRADING BACTERIA

Nguyen Ba Huu*, Dam Thuy Hang, Dang Thi Cam Ha

Institute of Biotechnology

SUMMARY

2,4-D and 2,4,5-T herbicide-degrading bacteria were found in several bacterial genera. Many of these bacteria were also detected in soil that collected from three regions of Vietnam including herbicide/dioxin contaminated "hot spot" in US former military base at Danang airport. The *tfdA*, *tfdA α* and *cadA*-like gene fragments were isolated in 2,4-D and 2,4,5-T degrading bacteria and also in total DNA samples that were directly extracted from soils in Danang "hot spot". However, there is no study on transfer of those genes within soil bacteria community. In this report, the *tfdA* and *cadA*-like gene fragments were detected in three dibenzofuran-degrading bacteria *Rhodococcus* sp. HDN3, *Paenibacillus* sp. Ao3 and *Terrabacter* sp. DMA that were isolated from soil and sediment in this site. The sequence analysis of *tfdA* gene fragments from both bacterial strains Ao3 and DMA revealed that they had 98% similarity to *tfdA* sequence in plasmid pJP4 of *Ralstonia eutropha* JMP134 and also a high homology level to those genes from 2,4-D degrading bacteria as well as from total soil DNA isolated from soil samples in Vietnam. In another hand, *tfdA* gene fragment in HDN3 strain showed

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38360892; Fax: 84-4-38363144; E-mail: nguyen.huu@ibt.ac.vn

99% homology to those gene fragments in 2,4-D utilizing bacteria such as *Burkholderia* sp. RASC and *Burkholderia* sp. Ff54. *cadA*-like gene fragments in both bacterial strains Ao3 and DMA showed 99 and 86% similarity respectively, to this *cadA*-like gene in HS07 clone originated from activated sludge that was admented 2,4-D.

Keywords: *biodegradation, cadA, dibenzofuran, dioxin, tfdA, 2,4-D, 2,4,5-T*