

## XÁC ĐỊNH ĐOẠN GEN MÃ HÓA DIOXYGENASE CỦA CHỦNG VI KHUẨN *PAENIBACILLUS* SP. A03 PHÂN HỦY DIBENZOFURAN PHÂN LẬP TỪ Bùn AO THUỘC KHU ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN TẠI ĐÀ NẴNG

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ Sinh học

### TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn A03 phân hủy dibenzofuran được phân lập từ bùn ao thuộc khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng. Khuẩn lạc chủng A03 màu trắng đục, tròn, trơn, lồi nhẹ, đường kính 1,5 - 3 mm sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường muối khoáng chứa dibenzofuran. Tế bào chủng A03 hình que, có kích thước 0,53 - 0,6  $\mu\text{m}$   $\times$  1,67 - 2,8  $\mu\text{m}$ . Kết quả phân tích trình tự 16S rDNA cho thấy chủng này có quan hệ gần gũi với các chủng thuộc chi *Paenibacillus* như *Paenibacillus* sp. HM1, *P. validus* JCM9077, *P. naphthalenovorans* DSM14203, *Paenibacillus* sp. YK5. Dựa trên các đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng A03 được xếp vào chi *Paenibacillus* và có tên là *Paenibacillus* sp. A03. Cặp mồi DIOXY-F, DIOXY-R và DNA tổng số chủng A03 đã được sử dụng để tách dòng đoạn gen mã hóa dioxygenase. Trình tự nucleotide của sản phẩm PCR nhân từ chủng A03 cho thấy chủng này mang đoạn gen dioxygenase và có mức tương đồng 93% với đoạn gen *ahDOa* của chủng *Paenibacillus* sp. YK5. Tuy nhiên, trình tự amino acid suy diễn của đoạn gen nhân từ chủng A03 giống hệt với sản phẩm đoạn gen *ahDOa* của chủng *Paenibacillus* sp. YK5. Để làm sáng tỏ mối quan hệ giữa các chủng A03 và YK5 cần thiết có thêm các phân tích phân loại hóa học, lai DNA:DNA cũng như xác định trình tự đầy đủ gen dioxygenase ở hai chủng vi khuẩn này.

**Từ khóa:** Dibenzofuran, gen mã hóa dioxygenase, *Paenibacillus*, vi khuẩn, 16S rRNA

### MỞ ĐẦU

Trong khoảng thời gian 10 năm từ 1961 - 1971, quân đội Mỹ đã sử dụng hơn 20 chất diệt cỏ khác nhau (hỗn hợp của 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)) chứa dibenzo-*p*-dioxin (DD) phun, rải xuống nhiều vùng ở miền Trung và Nam Việt Nam (Stellman *et al.*, 2003). Hiện nay, đất tại một số "điểm nóng" ở các căn cứ quân sự trước đây của Mỹ vẫn bị ô nhiễm nặng các chất diệt cỏ, DD, dibenzofuran (DBF) và các hợp chất tương tự. Tẩy độc các điểm nóng ở Đà Nẵng bằng phân hủy sinh học đang được tiến hành và cho kết quả rất khả quan (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005), phương pháp này có giá thành thấp và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, để nâng cao hiệu quả và áp dụng rộng rãi ở các "điểm nóng" khác cần có các nghiên cứu sâu về đa dạng, khả năng phân hủy sinh học và các gen tham gia quá trình phân hủy các chất độc trên của tập đoàn vi sinh vật bản địa. Trong số các chất độc trên các hợp chất DD và DBF được chú ý đặc biệt do tính độc cao của chúng, đặc biệt là 2,3,7,8-TCDD/DBF. Chuyển hóa sinh học các hợp chất DD, DBF có sự tham gia của quá trình khử loại chlor của vi khuẩn

ky khí, phân hủy bởi nấm với các enzyme cytochrome P-450, lignin peroxydase, laccase và phân hủy hiếu khí. Phân hủy hiếu khí DBF và DD diễn ra theo hai cơ chế oxy hóa vị trí bên và vị trí góc của nhân thơm, trong đó oxy hóa đầu tiên ở vị trí góc được thực hiện bởi enzyme dioxygenase được quan tâm hơn cả do con đường này dẫn đến chuyển hóa hoàn toàn DBF và DD (Armengaud *et al.*, 1998; Hiraishi, 2003). Trong các công trình công bố trước đây, chúng tôi mới chỉ quan tâm đến các vi sinh vật trong bãi đất nhiễm. Tuy nhiên, nước từ bãi đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin đều được chảy vào ao. Do vậy việc nghiên cứu vi sinh vật có khả năng sử dụng các hợp chất độc hại là hết sức cần thiết. Trong nghiên cứu này chủng vi khuẩn A03 sử dụng DBF được phân lập theo phương pháp làm giàu từ mẫu bùn ao, định tên dựa trên so sánh gen mã hóa 16S rRNA và xác định gen mã hóa enzyme dioxygenase.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Phân lập vi khuẩn

Mẫu bùn được lấy ở ao chứa nước chảy từ khu

đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng. Vi khuẩn sử dụng DBF được phân lập theo phương pháp làm giàu trên môi trường khoáng chứa 3 mM DBF ở 30°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Tiếp tục lặp lại đến lần làm giàu thứ 3 và gạt dịch huyền phù vi sinh vật trên môi trường khoáng thạch chứa DBF. Sau khoảng 7 ngày nuôi cấy, nhỏ 1 vài giọt dung dịch 100  $\mu$ M 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHB) lên các khuẩn lạc. Khuẩn lạc chuyển màu vàng được tách sạch và thử lại khả năng sử dụng DBF trên môi trường muối khoáng dịch.

### Xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA

Lấy 1 khuẩn lạc chủng Ao3 chuyển vào ống eppendorf 1,5 ml chứa 100  $\mu$ l đệm Tris-Cl 10 mM, pH 8,0, đun sôi 15 phút, sau đó ly tâm 10 phút ở 12000 vòng/phút. Hút 5  $\mu$ l dịch phía trên và nhân gen 16S rRNA với cặp mồi 27F và 1492R. Sản phẩm PCR được làm sạch theo kit QIAGEN. Trình tự nucleotide đoạn gen mã hóa 16S rRNA được xác định trực tiếp trên máy xác định trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer với bộ hóa chất sinh chuẩn BigDye Terminator (Perkin-Elmer) và sử dụng các mồi 27F, 530F, 945F, 518R, 1087R và 1492R. Trình tự nucleotide được xử lý trên phần mềm Sequencher version 4.0.5. Mức độ tương đồng của đoạn gen 16S rRNA chủng Ao3 được so sánh với các trình tự gen 16S rRNA trong GenBank và Ribosome Database Project (RDP). Cây phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự gen 16S rRNA được thiết kế dựa trên các phần mềm Clustal X, Bioedit version 6.0.7, Gendoc, Neighbour-Joining (NJ) tree, Mega. Trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA được đăng ký trong GenBank.

### Xác định trình tự đoạn gen mã hóa enzyme dioxygenase

Cặp mồi DIOXY-F (5'- TGY ASN TAY CAY GGV TGG -3') và DIOXY-R (5'- TBV GGN CCV YKN GGV TGC C - 3') được sử dụng trong nhân đoạn gen mã hóa enzyme dioxygenase. Phản ứng PCR nhân đoạn gen mã hóa enzyme dioxygenase từ chủng Ao3 được thực hiện với thể tích 50  $\mu$ l gồm 2,5  $\mu$ l mồi DIOX-F và DIOX-R (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l hỗn hợp 12,5 mM dNTPs, 5  $\mu$ l đệm PCR 10 lần, 0,4  $\mu$ l (5 đơn vị/  $\mu$ l) Taq polymerase, 5  $\mu$ l DNA tổng số vi khuẩn. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR với chu trình nhiệt như sau: 95 °C-5 phút, 34 chu kỳ (95°C -1 phút, 50°C -1 phút, 72°C -1 phút 10 giây), 72°C-7 phút, giữ ở nhiệt độ 4°C. Sản phẩm PCR được điện

đi trên gel agarose, nhuộm với EtBr, quan sát dưới tia UV, làm sạch sản phẩm PCR theo kit QIAGEN và xác định trình tự trực tiếp với cặp mồi DIOX-F và DIOX-R. Xử lý, so sánh trình tự và dựng cây phát sinh sử dụng như mô tả ở phần xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA. Trình tự đoạn gen và trình tự amino acid suy diễn (theo <http://www.expasy.org>) được đăng ký trên GenBank.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập và định loại vi khuẩn

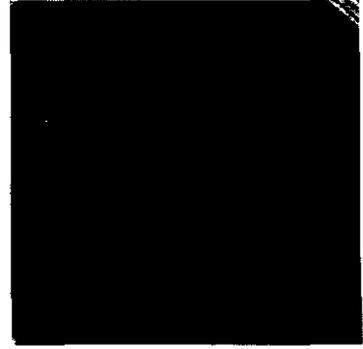
DNA tổng số được tách chiết và nhân đoạn gen 16S rRNA gần 1500 bp, làm sạch và xác định trình tự. Sau khi thực hiện ghép các trình tự xác định trực tiếp với 6 mồi 27F, 530F, 945F, 518R, 1087R và 1492R, đoạn gen 16S rRNA của chủng Ao3 có kích thước 1492 bp. Trình tự đoạn gen này được đăng ký trên GenBank với mã số EF208754.

Chủng vi khuẩn sử dụng DBF được phân lập như mô tả ở phần phương pháp. Sau 7 ngày nuôi cấy chủng Ao3 trên môi trường muối khoáng dịch chứa DBF, môi trường chuyển sang màu nâu chứng tỏ có sự phân hủy sinh học DBF. Trên môi trường muối khoáng thạch chứa DBF khuẩn lạc chủng Ao3 có màu trắng đục, lồi nhẹ, tròn trơn, kích thước khoảng 1,5-3 mm sau 7 ngày nuôi cấy (Hình 1). Chủng Ao3 có tế bào hình que, kích thước 0,53 - 0,6  $\mu$ m  $\times$  1,67 - 2,8  $\mu$ m (Hình 2).

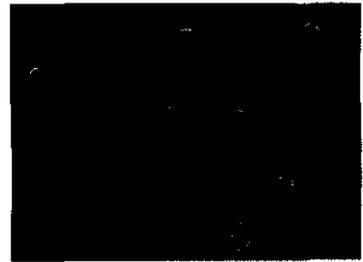
Hiện nay, các công bố cho thấy các vi khuẩn sử dụng DD, DBF và các hợp chất tương tự phân bố trong các lớp *Alphaproteobacteria* (*Novosphingobium*, *Porphyrobacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*), lớp *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Ralstonia* (*Wauteria*), *Comamonas*), lớp *Gammaproteobacteria* (*Erwinia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*), lớp *Actinobacteria* (*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Micobacterium*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Terrabacter-Janibacter*), ngành *Fimicutes* (loài *Bacillus megaterium*) (Ishiguro *et al.*, 2000; Hiraishi, 2003; Wang *et al.*, 2004). Gần đây, Iida và đồng tác giả đã phân lập được một số chủng vi khuẩn sử dụng DBF thuộc chi *Paenibacillus* như YK5, YK12, YK19 và YK20 từ một mẫu đất mếp nước sông và hồ quận Saitama và Yamanashi ở Nhật Bản. Các chủng vi khuẩn này có quan hệ gần gũi với các vi khuẩn thuộc loài *P. naphthalenovorans* sử dụng naphthalene (Iida *et al.*, 2006). Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng Ao3 có quan hệ

gần gũi với các vi khuẩn thuộc chi *Paenibacillus*. Chủng Ao3 có mức tương đồng gen 16S rRNA cao 96% với các chủng *Paenibacillus* sp. HM1 (1454/1506 nucleotide so sánh), *P. validus* JCM9077 (1430/1479 nucleotide), *P. naphthalenovorans* DSM14203 (1378/1423 nucleotide), *Paenibacillus* sp. YK5 và *Paenibacillus* sp. YK5 (1376/1421 nucleotide). Dựa trên một số đặc điểm hình thái và so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy chủng Ao3 thuộc về chi *Paenibacillus* và được đặt tên là *Paenibacillus* sp. Ao3. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy các đặc điểm hình thái và so sánh gen 16S rRNA giữa chủng *Paenibacillus* sp. Ao3, chủng *Paenibacillus* sp. YK5 và các chủng khác trong chi *Paenibacillus* tương đối khác xa nhau. Chi *Paenibacillus* là một chi vi khuẩn lớn gồm 61 loài. Do vậy, để có kết luận liệu chủng *Paenibacillus* sp. YK5 có thuộc một loài mới hay không? cần có thêm một số nghiên cứu đặc điểm sinh lý-sinh hóa, thành phần hóa học cấu trúc màng và thành tế bào cũng như lai DNA:DNA.

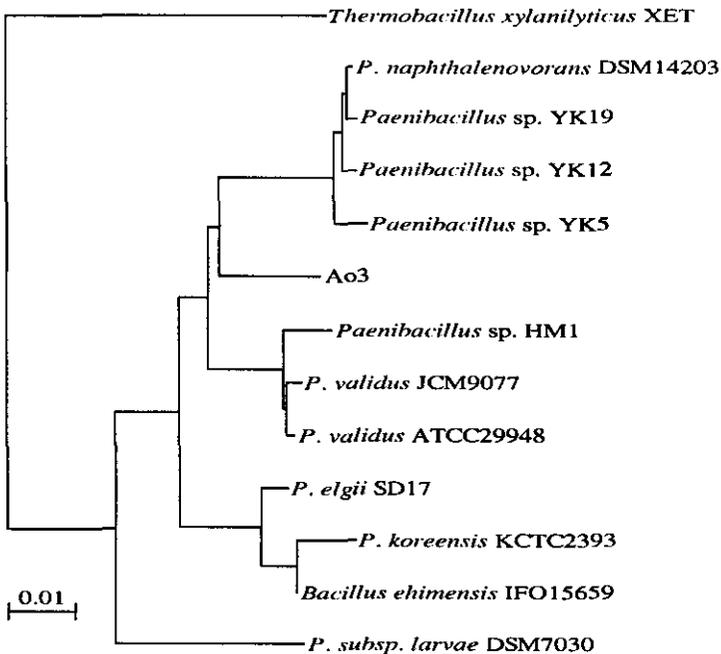
Kết quả phân lập và định tên chủng Ao3 cho thấy đây là chủng vi khuẩn thuộc chi *Paenibacillus* sử dụng DBF đầu tiên được phân lập từ bùn ao khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin.



Hình 1. Khuẩn lạc chủng Ao3.



Hình 2. Tế bào chủng Ao3 dưới kính hiển vi điện tử quét JEOL với độ phóng đại 15000 lần.

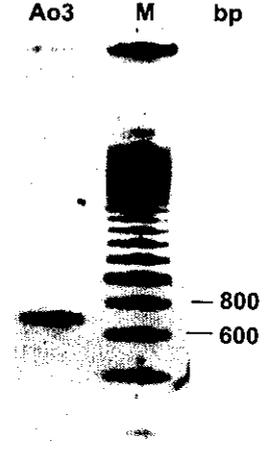


Hình 3. Cây phát sinh chủng loại chủng Ao3 và các chủng vi khuẩn đại diện dựa trên so sánh gen mã hóa 16S rRNA và sử dụng phần mềm NJ. Thước đo thể hiện 1 nucleotide khác nhau trên 100 nucleotide so sánh.

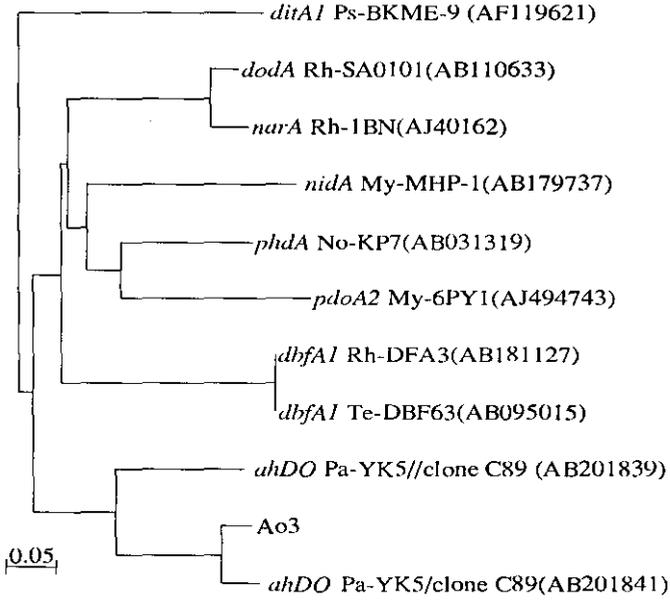
**Xác định trình tự đoạn gen mã hóa enzyme dioxygenase**

Hai quá trình oxy hóa DD, DBF và các hợp chất tương tự bởi vi khuẩn hiếu khí có sự tham gia của enzyme dioxygenase và được nghiên cứu nhiều nhất đó là gắn hai oxy ở vị trí bên 1,2 và đôi khi ở các vị trí 2,3 hoặc 3,4 của một nhân thơm và chuyển hóa DD, DF sang dạng cis-dihydrodiol và gắn hai oxy ở vị trí góc 4 và 4a của nhân thơm liền kề cầu nối ether và các sản phẩm trung gian đi tiếp vào chu trình Krebs. Con đường thứ hai được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm hơn cả và chủng vi khuẩn *Sphingomonas wittichii* RW1 là đối tượng được nghiên cứu chi tiết nhất (Armengaud *et al.*, 1998; Wittich, 1998; Nojiri, Omori, 2002). Ngoài ra các gen tham gia mã hóa DBF angular dioxygenase cũng được nghiên cứu nhiều ở vi khuẩn thuộc các chi *Terrabacter*, *Janibacter*, loài *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas stutzeri*. Các gen này gồm *dbfA12* mã hóa DF 4,4a dioxygenase, và *dbfA3* và *dbfA4* mã hóa dioxygenase tham gia vào hệ thống

vận chuyển điện tử (Hiraishi, 2003), *carAc* mã hóa carbazol 1,9a-dioxygenase (Sato *et al.*, 1997).



**Hình 4.** Sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hóa dioxygenase từ chủng Ao3. M: thang DNA 200 bp (Promega).



**Hình 5.** Cây phát sinh chủng loại giữa một số trình tự đại diện mã hóa enzyme  $\alpha$ -dioxygenase và trình tự nhân lên từ chủng Ao3 sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R. Thước đo thể hiện 5 nucleotide khác nhau trên trình tự 100 nucleotide so sánh.

Cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R được thiết kế dựa trên trình tự của một số gen mã hóa tiểu đơn vị  $\alpha$  của enzyme dioxygenase. Theo tính toán lý thuyết đoạn gen mã hóa tiểu đơn vị  $\alpha$ -dioxygenase nhân được sẽ có kích thước khoảng 600 bp. Kết quả ở hình 4 cho thấy sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã

hóa dioxygenase từ DNA tổng số của chủng Ao3 có kích thước như tính toán lý thuyết. Nghiên cứu khác sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R cho thấy sự tồn tại của đoạn gen mã hóa dioxygenase trong chủng vi khuẩn BU3 sử dụng dioxin (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005) và các vi khuẩn sử dụng DBF như

*Terrabacter* sp. DMA và *Rhodococcus* sp. HDN3 (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007a; 2007b).

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hóa dioxygenase từ chủng Ao3 được làm sạch và xác định trình tự trực tiếp. Trình tự đoạn gen này và trình tự amino acid suy diễn (Hình 6) được đăng ký trên GenBank với các số đăng ký lần lượt là EF203474 và ABM92957.1.

So sánh trình tự đoạn gen nhân lên từ chủng Ao3 cho thấy sản phẩm PCR nhân được có mức tương đồng cao 93% với trình tự dòng PCR C89 gen mã hóa tiểu đơn vị  $\alpha$  hydrocarbon dioxygenase của chủng *Paenibacillus* sp. YK5 (240/258 nucleotide so sánh) và 88% với trình tự dòng PCR 942 (40/45 nucleotide so sánh). Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn đoạn gen nhân lên từ chủng Ao3 và dòng PCR C89 của chủng *Paenibacillus* sp. YK5

```

ataacctgacggcgacctgatcgccattgtcgcgggggataaaatatatggagaagagatg
  N L D G D L I G I V A G D K I Y G E E M
gataagaagactggggcctgccccgattccgagagtagaggtatataaaggcttgatt
  D K K D W G L R P I P R V E V Y K G L I
tttgcaatctggaccctcaagctatgccgttggaggagttccttggcgagtttagatgg
  F A N L D P Q A M P L E E F L G E F R W
tatttggacatcatgctgggacggagcgatggagggatggaagtgcggggcgctgcctcag
  Y L D I M L G R S D G G M E V R G V P Q
cgctgggtcgttcatg
  R W V V H

```

**Hình 6.** Trình tự nucleotide đoạn gen mã hóa tiểu đơn vị  $\alpha$  của enzyme dioxygenase và trình tự amino acid suy diễn nhân lên từ DNA chủng *Paenibacillus* sp. Ao3 và cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R.

## KẾT LUẬN

Kết quả phân loại dựa trên một số đặc điểm hình thái và so sánh 16S rDNA cho thấy chủng vi khuẩn Ao3 sử dụng DBF phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng thuộc chi *Paenibacillus*. Chủng vi khuẩn này được đặt tên là *Paenibacillus* sp. Ao3. Đây là chủng vi khuẩn thuộc chi *Paenibacillus* sử dụng DBF đầu tiên được phân lập từ mẫu bùn ao khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở sân bay Đà Nẵng. Trình tự đoạn gen mã hóa enzyme dioxygenase của chủng Ao3 có mức tương đồng cao 93% với gen mã hóa tiểu đơn vị  $\alpha$  hydrocarbon dioxygenase của chủng vi khuẩn *Paenibacillus* sp. YK5.

**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 nhà chặm

cho thấy có mức tương đồng 100%. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu đặc điểm phân loại của các chủng *Paenibacillus* sp. YK5 và *Paenibacillus* sp. Ao3. Tuy nhiên, trình tự dòng PCR C89 rất ngắn và trong nghiên cứu này đoạn gen từ chủng Ao3 mới chỉ được xác định một phần. Do vậy, các kết quả bổ sung về phân loại và gen mã hóa dioxygenase là rất cần thiết để khẳng định chính xác mối quan hệ giữa các chủng vi khuẩn này.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy đoạn gen nhân lên từ các chủng sử dụng DBF *Terrabacter* sp. DMA và *Rhodococcus* sp. HDN3 sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R đều có quan hệ gần với gen *dbfA1* (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007a; 2007b). Kết quả trong nghiên cứu này một lần nữa khẳng định sự đa dạng gen mã hóa dioxygenase trong các chủng vi khuẩn sử dụng DBF.

*làm sạch ô nhiễm chất độc hóa học trong đất) thuộc chương trình 33 và quỹ học bổng DAAD (Cộng hòa Liên bang Đức).*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đặng Thị Cẩm Hà, Phạm Hữu Lý, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thị Đệ, Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Dương Nhã, Mai Anh Tuấn, La Thanh Phương, Nguyễn Thị Sánh, Nguyễn Thu Thủy, Đỗ Bích Thanh, Đỗ Ngọc Tuyên, Nguyễn Văn Minh, Nguyễn Văn Hồng (2005) Báo cáo nghiệm thu đề tài nhà nước “Nghiên cứu, phát triển công nghệ phân hủy sinh học và kỹ thuật nhà chặm làm sạch ô nhiễm chất độc hóa học trong đất” thuộc chương trình 33. Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia. Bộ Khoa học và Công nghệ.

Armengaud J, Happe B, Timmis KN (1998) Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome. *J Bacteriol* 180: 3954-66.

Hiraishi A (2003) Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilisation in bioremediation. *Microbes Environ* 18: 105-125.

Iida T, Nakamura K, Izumi A, Mukouzaka Y, Kudo T (2006) Isolation and characterization of a gene cluster for dibenzofuran degradation in a new dibenzofuran-utilizing bacterium, *Paenibacillus* sp. strain YK5. *Arch Microbiol* 184: 305-315.

Ishiguro T, Ohtake Y, Nakamura, Inamori Y, Amagi, Soma M, Matsushita H (2000) Biodegradation of dibenzofuran and dioxins by *Pseudomonas aeruginosa* and *Xanthomonas maltophilia*. *Environ Technol* 21:1309-1316.

Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2007a) 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 (2007b) 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* số 29(3): 83-89.

Nojiri H, Omori T (2002) Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 2001-2016.

Sato SI, Nam JW, Kasuga K, Nojiri H, Yamane H, Omori T (1997) Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J Bacteriol* 179: 4850-4858.

Stellman JM, Stellman SD, Christian R, Weber TA, Tomassalla C (2003) The extent and patterns of usage of agent orange and the herbicides in Vietnam. *Nature* 422: 681-687.

Wang Y, Yamazoe A, Suzuki S, Liu CT, Aono T, Oyaizu H (2004) Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading *Comamonas* sp. strains isolated from white clover roots. *Curr Microbiol* 49: 288-294.

Wittich RM (1998) Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 489-499.

## CHARACTERISATION OF A GENE FRAGMENT ENCODED DIOXYGENASE IN DIBENZOFURAN-DEGRADING BACTERIUM *PAENIBACILLUS* SP. Ao3 ISOLATED FROM HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL IN DANANG

Nguyen Ba Huu, Dang Thi Cam Ha\*

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

The dibenzofuran degrading bacterium Ao3 was isolated from pond mud in the herbicide/dioxin contaminated area in a former US military base at Danang Airport. Colony of Ao3 was cream white, round, slight convex and 1.5 - 3 mm diameter after 7 days of incubation in mineral salt medium containing dibenzofuran. Cells were rod shaped, with diameter ranging from 0.53 - 0.6  $\mu\text{m}$   $\times$  1.67 - 2.8  $\mu\text{m}$ . 16S rDNA sequence analysis indicated that strain Ao3 was closely related to strains in genus *Paenibacillus* including *Paenibacillus* sp. HM1, *Paenibacillus validus* JCM9077, *Paenibacillus naphthalenovorans* DSM14203, *Paenibacillus* sp. YK5. Based on morphological characteristics and analysis of 16S rRNA gene sequence, Ao3 strain should be placed in genus *Paenibacillus* and named *Paenibacillus* sp. Ao3. The degenerate primer pair DIOXY-F, DIOXY-R and total DNA of Ao3 strain were used for isolation a part of dioxygenase encoding gene. The nucleotide sequence of PCR product revealed that Ao3 carried the dioxygenase gene and had similar level of 93% to an *ahDOa* gene in *Paenibacillus* sp. YK5. However, the predicted amino acid sequence of dioxygenase gene product of Ao3 showed identical to *ahDOa* gene in *Paenibacillus* sp. YK5. In order to clarify the relationship between Ao3 and YK5, the DNA:DNA hybridisation and chemotaxonomy analysis as well as full nucleotide sequence of dioxygenase genes will be required.

**Keyword:** Bacteria, dibenzofuran, dioxygenase gene, *Paenibacillus*, 16S rRNA gene

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-8360892; Fax: 84-4-8363144; E-mail: [ha@mdp-ibt.ac.vn](mailto:ha@mdp-ibt.ac.vn)