

XÁC ĐỊNH GEN *tfdA* Ở MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN SỬ DỤNG 2,4-D PHÂN LẬP TỪ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN TẠI ĐÀ NẴNG

Nguyễn Bá Hữu¹, Đặng Thị Cẩm Hà¹, Dietmar H Pieper²

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trung tâm nghiên cứu bệnh truyền nhiễm Helmholtz, Đức

TÓM TẮT

Mười bảy chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) đã được phân lập từ các mẫu đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng. Trong số 17 chủng vi khuẩn, 14 chủng đã được xác định trình tự đoạn gen 16S rRNA và các chủng này đều thuộc chi *Burkholderia*. Đây là nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế trong đất nhiễm tại sân bay Đà Nẵng đã được phát hiện thông qua kỹ thuật không phụ thuộc nuôi cấy PCR-SSCP. Nhiều chủng thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia* được biết đến với khả năng phân hủy 2,4-D và có mang gen *tfdA*. Trình tự nucleotide của các đoạn gen *tfdA* mã hóa dioxygenase tham gia chuyển hóa 2,4-D ở 6 chủng vi khuẩn 1HD3, 2HD3, 3HD3, 1HD5, 2HD5, 3HD5 có các mức tương đồng 98 - 99% với trình tự nucleotide của 25 đoạn gen *tfdA* lớp I được nhân lên trực tiếp từ DNA tổng số của các mẫu đất nhiễm ở sân bay Đà Nẵng và tương đồng 98% với trình tự nucleotide của gen *tfdA* lớp I ở chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D *Cupriavidus necator* JMP134. Trình tự nucleotide của các đoạn gen *tfdA* lớp II trong 10 chủng 1HD1, 2HD1, 4HD5, 1HD6, 2HD6, 3HD6, 4HD6, 10DK.1, 10DK.2 và 10DK.3 tương đồng 100% với trình tự nucleotide gen *tfdA* lớp II ở các chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D *Burkholderia* sp. TFD34, *Burkholderia* sp. RASC và trình tự nucleotide 7 đoạn gen *tfdA* lớp II được nhân lên từ DNA tổng số của các mẫu đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở sân bay Đà Nẵng.

Từ khóa: *Burkholderia*, chất diệt cỏ, *Cupriavidus*, dioxin, *tfdA*, 2,4-D

MỞ ĐẦU

2,4-D và 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) là hai thành phần chính của các chất diệt cỏ chứa dioxin mà quân đội Mỹ đã sử dụng trong chiến tranh Việt Nam. Mặc dầu 2,4-D có thời gian bán phân hủy ngắn trong đất, nhưng hiện nay đất tại căn cứ quân sự của Mỹ trước kia ở sân bay Đà Nẵng vẫn bị ô nhiễm nặng 2,4-D, 2,4,5-T và dioxin (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2005). Các nghiên cứu trước đây đã phân lập được một số chủng vi sinh vật sử dụng 2,4-D từ các mẫu đất nhiễm ở khu vực sân bay Đà Nẵng. Nguyễn Bá Hữu và Đặng Thị Cẩm Hà đã định loại được hai chủng vi khuẩn *Arthrobacter* và phát hiện 2 gen *tfdA*, *cadA* mã hóa 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase (*TfdA*) và 2,4-D monooxygenase (*CadA*) tham gia bước đầu chuyển hóa 2,4-D ở hai chủng này (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007). Các nghiên cứu khác cũng đã định loại các nhóm vi khuẩn khác và các gen mã hóa các enzyme tham gia chuyển hóa 2,4-D ở các chủng vi khuẩn và trong các mẫu đất (Nguyen *et al.*, 2007; Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2008; Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2008). Cho đến nay, chưa có phát hiện thêm nào về

vi khuẩn sử dụng 2,4-D và gen *tfdA* từ các chủng vi khuẩn phân lập từ đất nhiễm tại sân bay Đà Nẵng. Trong nghiên cứu này, 17 chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D đã được phân lập từ các mẫu đất tại khu vực bãi nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở sân bay Đà Nẵng và xác định sự có mặt của gen *tfdA*. Đồng thời, các kết quả trong nghiên cứu này đóng góp các cơ sở khoa học về đa dạng chủng loại và gen chức năng trong quần xã vi khuẩn bản địa tại sân bay Đà Nẵng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập vi khuẩn sử dụng 2,4-D

Năm mẫu đất nhiễm HDN1, HDN3, HDN4, HDN5, HDN6 và mẫu đất trong công thức xử lý chôn lấp 10 m³ (10DNK) ở bãi nhiễm sân bay Đà Nẵng (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2007; Nguyen Ba Huu, Dang Thi Cam Ha, 2008) được sử dụng để phân lập vi khuẩn. Dịch huyền phù pha loãng đất nhiễm được gạt trên các đĩa petri chứa môi trường MM (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2007), cao nấm men (0,25 g/l) và 1 mM 2,4-D, 80 mg eosin B, 13 mg methylene blue và nuôi ở 30°C trong 7 ngày, các

khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch được tách và làm sạch trên môi trường tương tự.

Tách chiết DNA tổng số vi khuẩn

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, 2007).

Định loại vi khuẩn dựa trên so sánh trình tự gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA của vi khuẩn được nhân lên nhờ PCR với cặp mồi đa năng 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') và 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Sản phẩm PCR được làm sạch theo kit QIAgen. Trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA được xác định trực tiếp trên máy xác định trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer và được xử lý trên phần mềm Sequencher version 4.0.5. Mức độ tương đồng đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn được so sánh với các trình tự gen 16S rRNA trên GenBank. Cây phát sinh loài dựa trên sự so sánh trình tự gen 16S rRNA được thiết kế dựa trên các phần mềm Clustal X, Gendoc, Neighbor-Joining (NJ) tree. Trình tự đoạn gen 16S rRNA được đăng ký trên GenBank.

Xác định gen *tfdA*

Gen *tfdA* được nhân lên từ DNA tổng số ở các chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi *tfdA*αF, *tfdA*αR (Itoh *et al.*, 2002). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose, làm sạch với kit QIAgen và xác định trình tự trên máy ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer. Trình tự gen *tfdA* và trình tự amino acid suy diễn của các đoạn gen (theo <http://www.expasy.org>) được đăng ký trên GenBank. Cây phát sinh chủng loại trình tự amino acid suy diễn các đoạn gen *tfdA* được thiết kế dựa trên các phần mềm Clustal X, Gendoc, Neighbor-Joining (NJ) tree.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Định loại vi khuẩn

Mười bảy chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D đã được phân lập từ 5 mẫu đất ở bãi nhiễm chất độc hóa học chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng và trong công thức chôn lấp thông thường 10DNK (Bảng 1). Các tế bào vi khuẩn phân hủy 2,4-D, giải phóng acid, làm pH môi trường thay đổi và màu thuốc nhuộm tạo các

khuẩn lạc có màu tía sẫm (Newby *et al.*, 2000) được tách sạch.

Hiện nay, bên cạnh các nghiên cứu về hình thái, đặc điểm sinh lý-sinh hóa, cấu trúc màng và thành tế bào, xác định trình tự gen mã hóa ribosome RNA như 16S rRNA đã trở nên hết sức thông dụng. Kết quả xác định trình tự một phần đoạn gen 16S rRNA của 14 chủng vi khuẩn cho thấy, tất cả các chủng này đều có quan hệ gần gũi với các vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* (Bảng 1, Hình 1).

Chín chủng vi khuẩn 2HD1, 1HD3, 3HD3, 4HD5, 1HD6, 2HD6, 3HD6, 4HD6 và 10DK3 tương đồng 100% với nhiều chủng vi khuẩn chi *Burkholderia*. Năm chủng vi khuẩn còn lại 1HD1, 2HD3, 4HD3, 3HD5 và 4HD5 có mức tương đồng thấp hơn. Như vậy, dựa trên xác định trình tự đoạn gen 16S rRNA, 14 chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này đều thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia*. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của 14 chủng vi khuẩn được đăng ký trên GenBank với các mã số như ở bảng 1.

Trong 14 chủng vi khuẩn kể trên, chín chủng có mức tương đồng 100% về trình tự đoạn gen 16S rRNA. Do vậy, cần có thêm các kết quả như xác định toàn bộ đoạn gen 16S rRNA cũng như các kết quả so sánh "điểm chi phân tử khác" để khẳng định chính xác vị trí phân loại của 9 chủng vi khuẩn kể trên.

Các vi khuẩn chuyển hóa 2,4-D được xếp chủ yếu vào ba nhóm dựa trên các đặc điểm sinh lý và tiến hóa (Itoh *et al.*, 2004). Nhóm vi khuẩn phụ dưỡng thuộc *Beta-* và *Gamma-proteobacteria*, gồm các chi *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodospirillum* và *Variovorax* và đều mang các gen *tfd*. Nhóm thứ hai gồm các vi khuẩn *Alphaproteobacteria* phân lập từ đất nguyên thủy, đất trồng trọt ở Nhật Bản và có họ hàng gần với vi khuẩn thuộc chi *Bradyrhizobium*. Nhóm thứ ba gồm các thành viên của một loài thuộc chi *Sphingomonas* trong *Alphaproteobacteria*.

Khi nghiên cứu đa dạng vi khuẩn không phụ thuộc nuôi cấy sử dụng kỹ thuật đa hình cấu trúc sợi đơn (PCR-SSCP), Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả (2007) đã phát hiện các vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia*, lớp *Betaproteobacteria* chiếm ưu thế và có mặt trong cả 9 mẫu nhiễm (HDN1-HDN9) tại Đà Nẵng. Chi vi khuẩn *Burkholderia* chiếm ưu thế trong đất nhiễm chất da cam ở Hoa Kỳ (Rice *et al.*, 2005) và các vi khuẩn thuộc chi này cũng được phát hiện trong một số loại đất ở Việt Nam (Nguyễn *et al.*, 2007). Nghiên cứu của Bælum và đồng tác giả

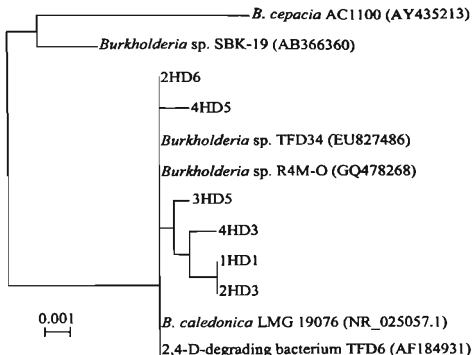
(2010) cho thấy, 16 trong số 31 chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D cũng thuộc chi *Burkholderia*. Như vậy, các chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D phân lập được trong nghiên cứu này cũng nằm trong các nhóm vi khuẩn sử dụng 2,4-D thường gặp. Tuy nhiên, các kỹ thuật phân lập cũng ảnh hưởng lớn đến các dạng chủng thu được (Bælum *et al.*, 2010) và các kỹ thuật phụ thuộc nuôi cấy chỉ phân lập được phần rất nhỏ vi khuẩn trong tự nhiên. Trong nghiên cứu trước đây về đa dạng vi sinh vật không phụ thuộc nuôi cấy đã nêu

ở trên, ngoài các vi khuẩn chi *Burkholderia*, lớp *Betaproteobacteria* chiếm ưu thế trong 9 mẫu đất nhiễm (HDN1-HDN9) còn có các chủng vi khuẩn thuộc chi *Alpha-* và *Gamma-proteobacteria* (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2007). Do vậy, 14 chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D thuộc chi *Burkholderia* có thể chỉ phản ánh mức độ đa dạng vi khuẩn sử dụng 2,4-D trong các mẫu với kỹ thuật phân lập trong nghiên cứu này và thực tế đa dạng vi khuẩn sử dụng 2,4-D có thể còn cao hơn nhiều.

Bảng 1. Nguồn gốc phân lập và so sánh trình tự gen 16S rRNA và *tfdA* của các chủng vi khuẩn.

Mẫu đất	Tên chủng	Trình tự gen 16S rRNA		Trình tự gen <i>tfdA</i>	
		Vi khuẩn gần gũi	Đăng ký GenBank	Vi khuẩn gần gũi	Đăng ký GenBank
HDN1	1HD1	<i>Burkholderia</i> sp.	EF073265	<i>Burkholdena</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47271
	2HD1	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	EF073266	<i>Burkholderia</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47275
HDN3	1HD3	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	EF073267	<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134 (<i>tfdA</i> lớp I)	HM47272
	2HD3	<i>Burkholdena</i> sp.	HM035487	<i>C. necator</i> JMP134 (<i>tfdA</i> lớp I)	HM47276
	3HD3	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	HM035489	<i>C. necator</i> JMP134 (<i>tfdA</i> lớp I)	HM47279
	4HD3	<i>Burkholderia</i> sp.	HM035492	kpt	kpt
HDN5	1HD5	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	HM035485	<i>C. necator</i> JMP134 (<i>tfdA</i> lớp I)	HM47273
	2HD5	kpt	kpt	<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134 (<i>tfdA</i> lớp I)	HM47277
	3HD5	<i>Burkholdena</i> sp.	HM035490	<i>C. necator</i> JMP134 (<i>tfdA</i> lớp I)	HM47280
	4HD5	<i>Burkholderia</i> sp.	HM035493	<i>Burkholderia</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47282
HDN6	1HD6	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	HM035486	<i>Burkholderia</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47274
	2HD6	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	HM035488	<i>Burkholderia</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47278
	3HD6	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	HM035491	<i>Burkholderia</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47281
	4HD6	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	HM035494	<i>Burkholderia</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47283
10DNK	10DK.1	kpt	kpt	<i>Burkholderia</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47284
	10DK.2	kpt	kpt	<i>Burkholdena</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47285
	10DK.3	<i>Burkholderia</i> sp. (TFD34, R4M-O)	HM035495	<i>Burkholderia</i> sp. RASC (<i>tfdA</i> lớp II)	HM47286

Chú thích: kpt: không phân tích



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại của một số chủng vi khuẩn phân lập từ đất nhiễm chất độc hóa học và các chủng đại diện thuộc chi *Burkholderia*. Thước đo chỉ 1 nucleotide khác nhau trên 1.000 nucleotide so sánh.

Xác định gen *tfdA* mã hóa TfdA

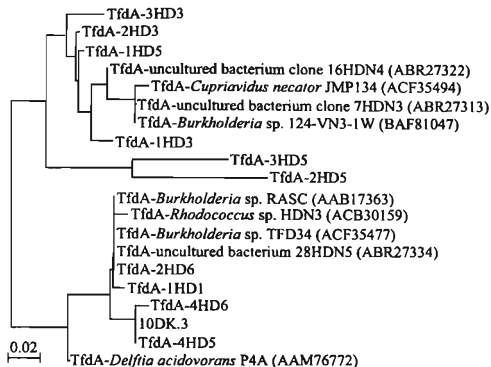
Vi khuẩn phân hủy 2,4-D được nghiên cứu nhiều nhất đó là *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (Don, Pemberton, 1981). Sau này, chủng vi khuẩn *A. eutrophus* JMP134 được đổi thành *Ralstonia eutropha* JMP134, *Wautersia eutropha* JMP134 và theo Vandamme và Coenye (2004) các vi khuẩn của loài *Wautersia eutropha* được xếp lại vào loài *Cupriavidus necator*. 2,4-D được chủng vi khuẩn JMP134 chuyển hóa sang dạng 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) nhờ enzyme TfdA mã hóa bởi gen *tfdA* nằm trên plasmid pJP4. McGowan và đồng tác giả (1998) khi so sánh trình tự gen *tfdA* ở 11 chủng vi khuẩn khác nhau đã chia *tfdA* thành 3 lớp. Trình tự nucleotide gen *tfdA* lớp II tương đồng 76% với *tfdA* lớp I, trong khi đó trình tự gen *tfdA* lớp III tương đồng 77% gen *tfdA* lớp I và 80% gen *tfdA* lớp II (McGowan *et al.*, 1998).

Các gen *tfdA* lớp I thường nằm trên các plasmid (ví dụ pJP4) có thể được chuyển cho nhiều tế bào chủ. 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 (Vedler *et al.*, 2000) của vi khuẩn *Achromobacter xylosooxidans* subsp. *denitrificans* EST4002 hoặc trong pJJB1 của *Delfia*

sp. 2a và *Delftia* sp. P4a (Poh *et al.*, 2002).

Các đoạn gen *tfdA* đã được nhân lên từ DNA tổng số của 16 chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở Đà Nẵng. Trình tự đoạn gen *tfdA* của 16 chủng vi khuẩn được đăng ký trên GenBank (Bảng 1).

So sánh trình tự các đoạn gen *tfdA* trong 16 chủng vi khuẩn cho thấy, các đoạn gen này có quan hệ gần gũi với *tfdA* lớp I (*C. necator* JMP134) và lớp II (*Burkholderia* sp. RASC) (Bảng 1). Trình tự đoạn gen *tfdA* lớp I ở 6 chủng 1HD3, 2HD3, 3HD3, 1HD5, 2HD5, 3HD5 có tương đồng 98-99% với 25 đoạn gen *tfdA* lớp I nhân được bằng PCR từ các mẫu DNA tách trực tiếp (ví dụ 7HDN3 và 16HDN4) từ đất nhiễm ở sân bay Đà Nẵng (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2007) và tương đồng 98% với gen *tfdA* lớp I ở chủng ở vi khuẩn sử dụng 2,4-D *C. necator* JMP134. Trong khi đó, gen *tfdA* lớp II ở 10 chủng 1HD1, 2HD1, 4HD5, 1HD6, 2HD6, 3HD6, 4HD6, 10DK.1, 10DK.2 và 10DK.3 lại có tương đồng 100% với gen *tfdA* lớp II ở các chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D *Burkholderia* sp. TFD34, *Burkholderia* sp. RASC và 7 đoạn gen *tfdA* lớp II nhân được bằng PCR từ các mẫu DNA (ví dụ 28HDN5) tách trực tiếp từ đất nhiễm ở sân bay Đà Nẵng (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2008).



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại trình tự amino acid suy diễn từ các đoạn gen *tfdA* của một số chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này và một số chủng đại diện. Thước đo thể hiện 2 amino acid khác nhau trên 100 amino acid so sánh.

Trình tự đoạn gen *tfdA* lớp II ở 10 chủng 1HD1, 2HD1, 4HD5, 1HD6, 2HD6, 3HD6, 4HD6, 10DK.1, 10DK.2 và 10DK.3 giống hệt nhau. Trong khi đó trình tự đoạn gen *tfdA* lớp I ở 6 chủng 1HD3, 2HD3, 3HD3, 1HD5, 2HD5 và 3HD5 có một số nucleotide khác nhau.

So sánh trình tự amino acid suy diễn từ các đoạn gen *tfdA* thu được từ các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này cũng có kết quả tương tự như khi so sánh trình tự nucleotide. Nhóm thứ nhất gồm các trình tự amino acid suy diễn từ các đoạn gen *tfdA* của các chủng 1HD5, 2HD5, 3HD5, 1HD3, 2HD3 và 3HD3 tương đồng cao với trình tự amino acid của TfdA từ chủng *C. necator* JMP134 (Hình 2). Nhóm thứ hai gồm 10 chủng như 1HD1, 2HD1, 4HD5, 1HD6, 2HD6, 3HD6, 4HD6, 10DK.1, 10DK.2 và 10DK.3 và trình tự amino acid suy diễn từ các đoạn gen *tfdA* ở 10 chủng này có tương đồng cao với trình tự amino acid của TfdA từ chủng *Burkholderia* sp. RASC (Hình 2). Trong nhóm thứ hai, trình tự amino acid suy diễn từ các đoạn gen *tfdA* của 6 chủng 2HD1, 1HD6, 2HD6, 3HD6, 10DK.1 và 10DK.2 giống hệt nhau.

Như vậy, trong số các chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D phân lập được từ đất nhiễm ở Đà Nẵng đã có sự khác nhau về nguồn gốc phát sinh loài (dựa trên gen 16S rRNA) và gen chức năng *tfdA*. Các nghiên cứu trước đây về gen *tfdA* trong các mẫu đất và chủng vi khuẩn phân lập từ đất nhiễm ở Đà Nẵng đã phát hiện được cả *tfdA* (Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, 2008) và gen *tfdA* lớp I chiếm ưu thế. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này gen *tfdA* lớp II lại chiếm ưu thế hơn trong các chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D phân lập được.

KẾT LUẬN

Mười bảy chủng vi khuẩn sử dụng 2,4-D phân lập từ bãi đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng có trình tự gen *tfdA* thuộc lớp I ở vi khuẩn *C. necator* JMP134 và lớp II ở vi khuẩn *Burkholderia* sp. RASC, trong đó gen *tfdA* lớp II chiếm ưu thế. Trong số 17 chủng vi khuẩn phân lập được, 14 chủng đã được xác định trình tự đoạn gen 16S rRNA và chúng thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia*, đây là chi vi khuẩn chiếm ưu thế trong đất nhiễm ở sân bay Đà Nẵng.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bælum J, Jacobsen CS, Holben WE (2010) Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. *Syst Appl Microbiol* 33: 67-70.
- Đặng Thị Cẩm Hà, Phạm Hữu Lý, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thị Đệ, Nguyễn Ngọc Minh, Nguyễn Dương Nhã, Mai Anh Tuấn, La Thanh Phương, Nguyễn Thị Sánh, Nguyễn Thu Thủy, Đỗ Bích Thanh, Đỗ Ngọc Tuyền, 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.
- Don RH, Pemberton JM (1981) Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 145: 681-686.
- 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-Azospira* 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* and *cadA*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Appl Environ Microbiol* 70: 2110-2118.
- McGowan C, Fulthorpe R, Wright A, Tiedje JM (1998) Evidence for interspecies gene transfer in the evolution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degraders. *Appl Environ Microbiol* 64: 4089-4092.
- Newby DT, Gentry TJ, Pepper IL (2000) Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in pJP4 donors. *Appl Environ Microbiol* 68(8): 3399-3407.
- Nguyễn Bá Hữu, Đàm Thủy Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà (2008) Xác định các đoạn gen mã hóa enzyme chuyển hóa chất diệt cỏ từ ba chủng vi khuẩn phân hủy dibenzofuran. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(2): 257-264.
- Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2007) 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.
- Nguyen Ba Huu, Dang Thi Cam Ha (2008) Change of microbial community structure during active landfill bioremediation of herbicide/dioxin contaminated soil in Da Nang. *Adv Nat Sci* 9(3): 337-344.
- Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà (2008) Nghiên cứu sự phân bố của gen tham gia phân hủy 2,4-D trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin bằng hai kỹ thuật SSCP fingerprint and MPN-PCR. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(1): 127-132.
- Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà, Pieper DH (2007) Xác định cấu trúc tập đoàn vi khuẩn trong đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng dựa trên phân tích đa hình cấu trúc sợi đơn gen 16S rRNA. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(1): 123-132.
- 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.
- Poh R, Xia X, Bruce LJ, Smith ARW (2002) 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia cepacia* strain 2a and *Ralstonia eutropha* JMP134. *Microbiology* 105: 43-63.
- Rice JF, Menn F-M, Hay AG, Sanseverino J, Sayler GS (2005) Natural selection for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid mineralizing bacteria in agent orange contaminated soil. *Biodegradation* 16: 501-512.
- 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.
- Vandamme P, Coenye T (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Inter J Syst Evol Microbiol* 54: 2285-2289.
- 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 *tfdA* GENE IN SOME 2,4-D UTILIZING BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL IN DA NANG

Nguyen Ba Huu¹, Dang Thi Cam Ha^{1,*}, Dietmar H Pieper²

¹Institute of Biotechnology, Hanoi, Vietnam

²Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

SUMMARY

Seventeen 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) utilizing bacterial strains were isolated from herbicide/dioxin contaminated soil in former military base in Da Nang. Among those, 14 bacteria strains were characterised based on 16S rRNA gene sequences and all of them belonged to genus *Burkholderia*. The bacteria in this genus were dominated or microbes in native bacterial community that was detected in these contaminated soil samples by cultured independence PCR-SSCP technique. Many bacterial representative of *Burkholderia* genus were able to degrade 2,4-D and containing *tfdA* gene. The partial nucleotide sequences of *tfdA* genes encoding 2,4-D dioxygenase in 6 bacterial strains 1HD3, 2HD3, 3HD3, 1HD5, 2HD5 and 3HD5 showed high similarity levels 98 - 99% to nucleotide sequences of *tfdA* genes of class I in 25 DNA clones directly amplified from total DNA of herbicide/dioxin contaminated soil samples in Da Nang and also 98% homology to nucleotide sequences of *tfdA* gene of class I in 2,4-D degrading bacterial strain, *Cupriavidus negator* JMP134. While, the partial nucleotide sequence *tfdA* gene of II class in 10 bacterial strains 1HD1, 2HD1, 4HD5, 1HD6, 2HD6, 3HD6, 4HD6, 10DK.1, 10DK.2 and 10DK.3 showed an identical to nucleotide sequences of *tfdA* genes in II class in 2,4-D degrading bacterial strains *Burkholderia* sp. TFD34, *Burkholderia* sp. RASC and also the nucleotide sequences of *tfdA* genes of II class in 7 DNA clones directly amplified from total DNA of herbicide/dioxin contaminated soil samples in the Da Nang former military base.

Keywords: *Burkholderia*, *Cupriavidus*, dioxin, herbicide, *tfdA*, 2,4-D