

XÁC ĐỊNH ĐOẠN GIEN MÃ HOÁ DIOXYGENAZA CỦA CHÙNG XẠ KHUẨN PHÂN HỦY DIBENZOFURAN *RHODOCOCCLUS* SP. HDN3 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT NHIỄM CHẤT DIỆT CỎ CHỨA DIOXIN TẠI ĐÀ NẴNG

NGUYỄN BÁ HỮU, ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong khoảng thời gian từ 1961 - 1971, quân đội Mỹ đã rải khoảng 100 triệu lít chất diệt cỏ (hỗn hợp của 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)) chứa dioxin (DD) xuống nhiều vùng ở miền Trung và Nam Việt Nam [12]. 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 kể trên, DD, dibenzofuran (DBF) và các hợp chất tương tự. Tẩy độc đất nhiễm tại “điểm nóng” sân bay Đà Nẵng bằng phương pháp phân hủy sinh học đang tiến hành và cho kết quả rất khả quan [2]. Tuy nhiên, để nâng cao hiệu quả, mở rộng qui mô xử lý 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 vi sinh vật bản địa. 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. Vi sinh vật hiếu khí tấn công DBF và DD theo hai cơ chế oxy hoá vị trí bên và vị trí góc của nhân thơm [1, 3, 10]. Trong đó oxy hoá đầu tiên ở vị trí góc được thực hiện bởi tiểu đơn vị alpha angular dioxygenaza được quan tâm hơn cả do con đường này dẫn đến chuyển hoá hoàn toàn DBF và DD [1, 3, 10, 14]. Một số chi xạ khuẩn *Terrabacter*, *Janibacter*, *Microbacterium* và *Rhodococcus* có khả năng sử dụng DBF và DD theo một hoặc hai cơ chế oxy hoá kể trên [3, 4, 6-10]. Trong nghiên cứu này chúng xạ khuẩn HDN3 sử dụng DBF được phân lập, định tên dựa trên so sánh gen 16S rRNA, xác định gen mã hóa enzym angular dioxygenaza và khả năng phân hủy sinh học DBF.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Phân lập vi khuẩn

Đất nhiễm chất diệt cỏ tại căn cứ quân sự cũ của Mỹ ở sân bay Đà Nẵng được lấy ở độ sâu từ 5 - 20 cm. 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 theo như mô tả ở công bố của Nguyễn Bá Hữu [8, 9].

2. Xác định trình tự gen 16S rRNA

Tách ADN tổng số, nhân gen 16S rRNA với cặp mồi 27F và 1492R, làm sạch sản phẩm PCR, xác định trực tiếp trên máy xác định trình tự nucleotide tự động, xử lý trình tự trên phần mềm Sequencher version 4.0.5, so sánh mức độ tương đồng của đoạn gen 16S rRNA, dựng cây phát sinh loài theo như mô tả công bố của của Nguyễn Bá Hữu [8, 9]. Trình tự đoạn gen 16S rRNA được đăng kí trên GenBank.

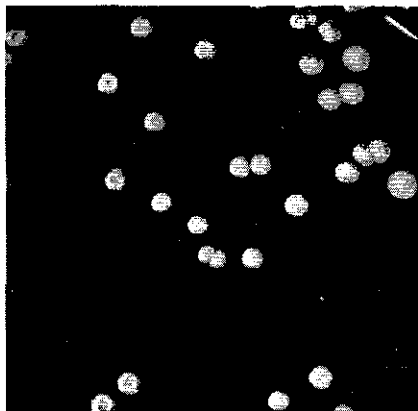
3. Xác định trình tự đoạn gen mã hoá enzym dioxygenaza

Phản ứng PCR nhân đoạn gen mã hoá enzym dioxygenaza từ chủng HDN3 được thực hiện với thể tích 50 µl gồm 2,5 µl mồi mỗi loại (10 µM), 1 µl hỗn hợp dNTP 12,5 mM, 5 µl đệm PCR

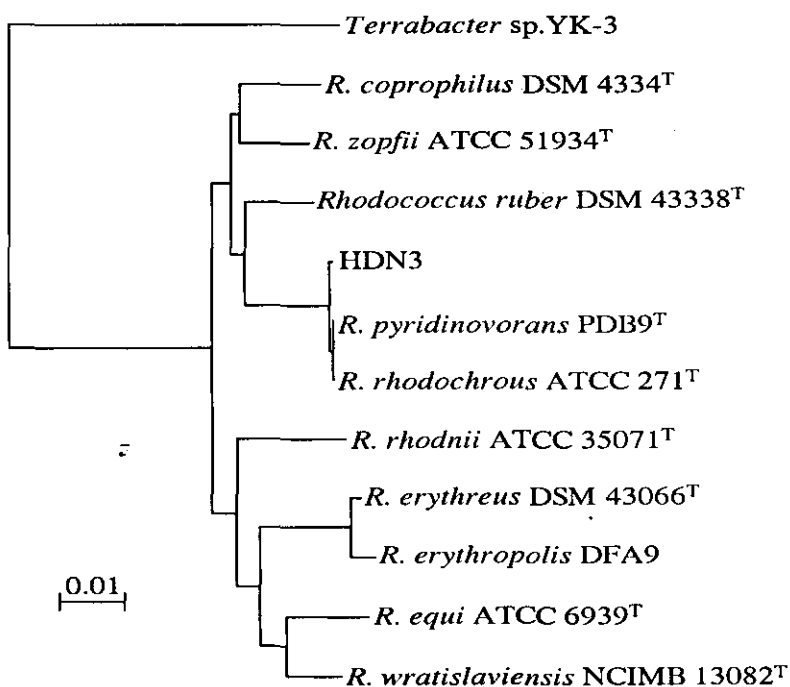
10 lần, 0,4 μ l enzym *Taq* polymeraza (5 đơn vị/ μ l), 5 μ l ADN tổng số vi khuẩn. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR, sản phẩm PCR được điện di, nhuộm với EtBr, quan sát dưới tia UV, làm sạch sản phẩm PCR, xác định trình tự trực tiếp với cặp mồi DIOX-F và DIOX-R, xử lí, so sánh trình tự và dựng cây phát sinh như mô tả của Nguyễn Bá Hữu [8, 9]. Trình tự đoạn gen và trình tự axit amin suy diễn (theo <http://www.expasy.org>) được đăng kí trên GenBank.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và định loại vi khuẩn



Hình 1. Khuẩn lạc chủng HDN3



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại chủng HDN3

Thước đo thể hiện 1 nucleotid khác nhau trên 100 nucleotid so sánh

Chủng vi khuẩn HDN3 sử dụng DBF được phân lập theo phương pháp làm giàu. Sau 7 ngày nuôi cấy chủng HDN3 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 HDN3 màu da cam, lồi nhẹ, tròn trơn, kích thước khoảng 2 - 3 mm sau 7 ngày nuôi cấy (hình 1). Chủng HDN3 thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương.

ADN 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 môi 27F, 530F, 945F, 518R, 1087R và 1492R, đoạn gen 16S rRNA của chủng HDN3 có kích thước 1490 bp. Trình tự này được đăng kí trên ngân hàng GenBank với mã số EF065609.

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*, *Nocardioideis*, *Rhodococcus*, *Terrabacter-Janibacter*), ngành *Fimicutes* (*Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp. BU3) [2, 3, 5, 9, 13, 14]. Gần đây, Iida và cộng sự, Nguyễn Bá Hữu và Đặng TC Hà đã phân lập được một số chủng vi khuẩn sử dụng DBF thuộc chi *Paenibacillus* từ một mẫu đất mép nước sông và hồ quận Saitama và Yamanashi ở Nhật Bản và đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở Đà Nẵng, Việt Nam [4, 8]. Vi khuẩn sử dụng DD và DBF thuộc chi *Rhodococcus* bao gồm các chủng *Rhodococcus erythropolis* SBUG 271, *Rhodococcus opacus* SAO101, *Rhodococcus* TUT581, *Rhodococcus* sp. YK2 [3, 7]. Đặc biệt chủng *Rhodococcus opacus* SAO101 có khả năng sử dụng MCDD và DCDD (hai hợp chất DD chứa 1 và 2 nguyên tử clo) [7]. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng HDN3 có quan hệ gần gũi với các vi khuẩn Gram dương của chi xạ khuẩn *Rhodococcus*. Chủng HDN3 có mức tương đồng gen 16S rRNA cao nhất 98,4% với chủng *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 271^T, 97,3% với *Rhodococcus* sp. PA và *Rhodococcus* sp. P7, 96,7% với *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T. Ngoài ra, so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng HDN3 còn cho thấy sự tương đồng cao 94% với các chủng *Rhodococcus opacus* SAO101, *Rhodococcus* sp. YK2 sử dụng DBF và DD.

Dựa trên các đặc điểm hình thái và kết quả so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA trên RDP cho thấy chủng HDN3 có thể được xếp vào chi *Rhodococcus* và có tên là *Rhodococcus* sp. HDN3. Kết quả phân lập và định tên chủng HDN3 cho thấy đây là chủng vi khuẩn thuộc chi *Rhodococcus* sử dụng DBF đầu tiên được phân lập từ đất nhiễm các chất diệt cỏ chứa dioxin. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác hơn về vị trí phân loại của chủng HDN3 cần có thêm nghiên cứu đặc điểm sinh lý-sinh hoá và lai ADN-ADN.

2. Xác định trình tự đoạn gen mã hoá enzym dioxygenaza

Oxy hoá có sự tham gia của hai nguyên tử oxy (dioxygenation) là một trong các phản ứng đầu tiên, quan trọng của phân hủy sinh học các hợp chất nhân thơm bởi vi khuẩn. Hai kiểu chủ yếu oxy hoá các hợp chất thơm bởi enzym dioxygenaza là gắn hai nguyên tử oxy ở vị trí bên (lateral dioxygenation) 1,2 và đôi khi ở các vị trí 2,3 hoặc 3,4 của một nhân thơm và gắn hai nguyên tử oxy ở vị trí góc (angular dioxygenation) 4 và 4a của nhân thơm liên kề cầu nối ete (ether) [1, 3, 6, 10, 14]. Trong thời gian qua, các nghiên cứu tập trung nhiều vào các gen và enzym tham gia gắn hai nguyên tử oxy ở vị trí góc của các hợp chất DD và DBF [1, 10, 14]. Các gen tham gia mã hoá DD/DBF dioxygenaza được nghiên cứu nhiều ở vi khuẩn thuộc các chi *Sphingomonas*, *Terrabacter*, *Rhodococcus*, *Janibacter*, loài *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas stutzeri*. Các gen này gồm *dbfA1* và *dbfA2* mã hoá DBF- 4,4a dioxygenase, và

dbfA3 và *dbfA4* mã hoá dioxygenaza tham gia vào hệ thống vận chuyển điện tử, *dfdB* mã hoá extradiol dioxygenaza, *carAc* mã hoá carbazol 1,9a-dioxygenaza [1, 4, 8, 9, 10, 11, 14].

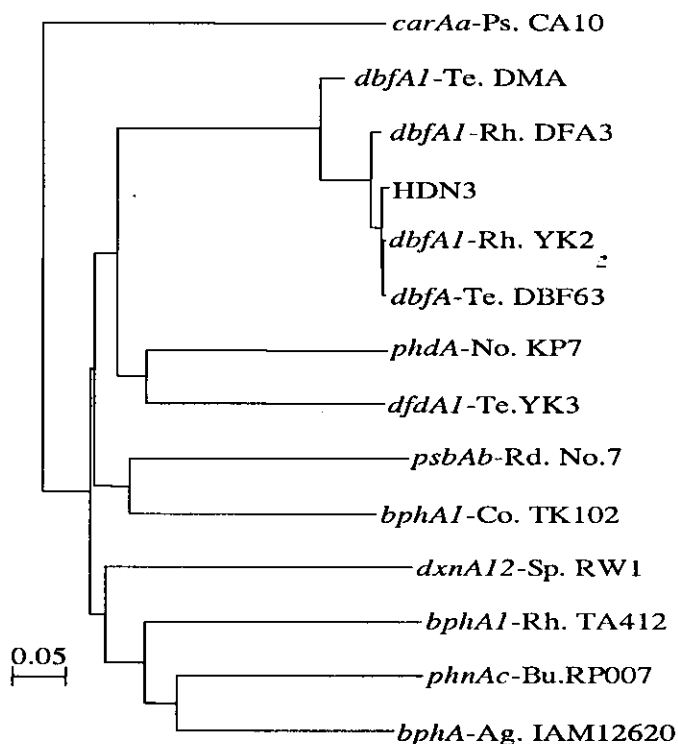
Cặp mồi DIOXY-F (5'- TGY ASN TAY CAY GGV TGG- 3') và DIOXY-R (5'- TBV GGN CCV YKN GGV TGC C- 3') đã được thiết kế và tổng hợp để nhân đoạn gen mã tiểu đơn vị alpha của enzym dioxygenaza từ các chủng vi khuẩn hiếu khí sử dụng DD, DBF và các hợp chất nhân thơm và hợp chất tương tự [9]. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen mã hoá dioxygenaza từ chủng HDN3 với cặp mồi trên được làm sạch và xác định trình tự trực tiếp (hình 3). Trình tự đoạn gen này và trình tự axit amin suy diễn được đăng kí trên ngân hàng GenBank với số đăng kí EF200065 và ABM92931.

```
acctacagcaacaacggcgatctaatcggtgtaccgcgcgcagataccgtctaccatggc
T Y S N N G D L I G V P R A D T V Y H G
gagctggacaagtcgcggctaggtctgaaggccgttccgcgggtggagaactacaagggt
E L D K S R L G L K A V P R V E N Y K G
ttcatcttcgcccaattgggacgaggacgccatcccgcgtggtggactacctcggcgctgac
F I F A N W D E D A I P L V D Y L G A D
cagctctggatatctggacctggccttcgagggcgccgctcggcggggtcgcaggtgatcggc
Q L W Y L D L A F E A P L G G L E V I G
cccacgatgaagttccgggatcaaggccaactggaagctggcgggcgagaaacttcgccggc
P T M K F R I K A N W K L A A E N F A G
gacgactaccacgtgctctacacacatgggtcggccttcagatcgggtctcctccccgat
D D Y H V L Y T H G S A F Q I G F L P D
tacgacacgctcggcgactacatcgcatacttcggccacggccacgggatggcgacatc
Y D T L G D Y I A Y F G H G H G M G D I
agcaagccccggccgggcctatcagaacgacgtcgggatgggtcagttcctcggggccggag
S K P G R A Y Q N D V G M A Q F L G P E
gcgatcgagtacgtcaacgcggtgcacgagcgggtcaaggccccgggtctccccgctgcag
A I E Y V N A V H E R L K A R V S P L Q
gcgagatgcacggggtcggtcagggcaatatcttcccgaacctgtcatggatcaagttc
A E M H G L G Q G N I F P N L S W I K F
ggcgtcttccacgtcttcggggtcttccaatggca
G V F H V F G L F Q W
```

Hình 3. Trình tự nucleotid đoạn gen mã hoá tiểu đơn vị alpha của enzym dioxygenaza và trình tự axit amin suy diễn nhân lên từ ADN chủng *Rhodococcus* sp. HDN3 và cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R

Kết quả ở hình 4 cho thấy đoạn gen nhân lên từ chủng HDN3 có mức tương đồng cao với các gen tham gia phân hủy DBF ở một số chủng xạ khuẩn. Trình tự đoạn gen nhân lên từ chủng HDN3 có mức tương đồng 99% với gen mã hoá tiểu đơn vị alpha angular dioxygenaza của các chủng xạ khuẩn *Terrabacter* sp. DBF63 (629/635 nucleotid so sánh), *Mycobacterium* sp. YK18 (265/267 nucleotid so sánh); 98% với gen mã hoá tiểu đơn vị alpha angular dioxygenaza của các chủng xạ khuẩn *Rhodococcus* sp. YK2 (628/635 nucleotid so sánh), *Rhodococcus* sp. DFA3 (534/540 nucleotid so sánh). Kết quả so sánh trình tự axit amin suy diễn từ trình tự sản phẩm PCR nhân lên từ chủng HDN3 cũng cho kết quả tương tự. Chủng HDN3 có mức tương đồng cao với trình tự axit amin của các enzym dioxygenaza ở các chủng xạ khuẩn sử dụng DBF như *Terrabacter* sp. DBF63, *Rhodococcus* sp. YK2, *Rhodococcus* sp. YK1, *Rhodococcus* sp. DFA3, *Mycobacterium* sp. YK18, và *Paenibacillus* sp. YK5. Như vậy sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R đã nhân được mã hoá tiểu đơn vị alpha angular dioxygenaza từ ADN tổng số chủng *Rhodococcus* sp. HDN3.

Trong một số nghiên cứu khác sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R cũng đã phát hiện sự tồn tại của đoạn gen mã hoá dioxygenaza trong chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. BU3 sử dụng DD [2] và chủng xạ khuẩn *Terrabacter* sp. DMA sử dụng DBF [9].



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại giữa một số trình tự đại diện gen mã hoá tiểu đơn vị enzym alpha dioxygenaza và trình tự nhân lên từ chủng HDN3 sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R. Thước đo thể hiện 5 nucleotid khác nhau trên trình tự 100 nucleotid so sánh

III. KẾT LUẬN

Dựa trên so sánh 16S rDNA và một số đặc điểm hình thái cho thấy chủng vi khuẩn Gram dương 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 *Rhodococcus*. Chủng vi khuẩn này được đặt tên là *Rhodococcus* sp. HDN3. Sử dụng cặp mồi DIOXY-F và DIOXY-R đã nhân được đoạn gen mã hoá enzym dioxygenaza từ chủng HDN3. Trình tự đoạn gen mã hoá enzym dioxygenaza của chủng HDN3 có mức tương đồng cao 99% với đoạn gen mã hoá dioxygenaza của các chủng xạ khuẩn *Terrabacter* sp. DBF63 (629/635 nucleotid so sánh), *Mycobacterium* sp. YK18 (265/267 nucleotid so sánh); 98% với gen mã hoá tiểu đơn vị alpha angular dioxygenaza của các chủng xạ khuẩn *Rhodococcus* sp. YK2 (628/635 nucleotid so sánh), *Rhodococcus* sp. DFA3 (534/540 nucleotid so sánh).

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 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. J. Armengaud, B. Happe, and K. N. Timmis - Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. Strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome, *J. Bacteriol.* **180** (1998) 3954-66.
2. Đặng T. C. 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 - 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 hoá học trong đất" thuộc chương trình 33. Trung tâm thông tin khoa học và công nghệ Quốc gia. Bộ Khoa học và Công nghệ, 2004.
3. A. Hiraishi - Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilisation in bioremediatio, *Microbes Environ.* **18** (2003) 105-125.
4. T. Iida, K. Nakamura, A. Izumi, Y. Mukouzaka, T. Kudo - Isolation and characterization of a gene cluster for dibenzofuran degradation in a new dibenzofuran-utilizing bacterium, *Paenibacillus* sp. strain YK5. *Arch. Microbiol.* **184** (2006) 305-315.
5. T. Ishiguro, Y. Ohtake, N. Inamori, Y. Amagi, M. Soma, H. Matsushita - Biodegradation of dibenzofuran and dioxins by *Pseudomonas aeruginosa* and *Xanthomonas maltophilia*, *Environ. Technol.* **21** (2000) 1309-1316.
6. N. Kimura, W. Kitagawa, T. Mori, N. Nakashima, T. Tamura, Y. Kamagata - Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73** (2006) 474-84.
7. N. Kimura, R. Urushigawa - Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzo-p-dioxin by a Gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO 101, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92** (2001) 138-143.
8. Nguyễn Bá Hữu, Đặng T. C. Hà - Xác định đoạn gen mã hoá dioxygenaza từ chủng vi khuẩn phân hủy dibenzofuran *Paenibacillus* sp. Ao3 phân lập từ bùn ao thuộc khu đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại Đà Nẵng, Tạp chí Công nghệ sinh học đã gửi đăng (2007).
9. Nguyễn Bá Hữu, Đặng T.C. Hà - Xác định gen mã hoá 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 đã gửi đăng (2007).
10. H. Nojiri, T. Omori - Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (2002) 2001-2016.
11. S. I. Sato, J. W. Nam, K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori - Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxygenase in *Pseudomonas* sp. strain CA10, *J. Bacteriol.* **179** (1997) 4850-4858.
12. J. M. Stellman, S. D. Stellman, R. Christian, T. A. Weber, C. Tomassalla - The extent and patterns of usage of agent orange and the herbicides in Vietnam, *Nature* **422** (2003) 681-687.

13. Y. Wang, A. Yamazoe, S. Suzuki, C. T. Liu, T. Aono, H. Oyaizu - Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading *Comamonas* sp. strains isolated from white clover roots, *Curr. Microbiol.* **49** (2004) 288–294.
14. R. M. Wittich - Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49** (1998) 489-499.

SUMMARY

CHARACTERISATION A PART OF GENE ENCODED DIOXYGENASE OF DIBENZOFURAN DEGRADATING STRAIN *RHODOCOCCUS* SP. HDN3 ISOLATED FROM HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL IN DANANG

The dibenzofuran degrading bacterial strain HDN3 was isolated from heavy herbicide/dioxin contaminated soil in a US former military base at Danang Airport. Colony of HDN3 is orange, round, slight convex and 2 - 3 mm diameter after 7 days of incubation in mineral salt medium containing dibenzofuran. Cells of HDN3 strain were Gram-positive. Analysis of 16S rDNA sequence showed that strain HDN3 was closely related to *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 271^T (98.4%), *Rhodococcus* sp. PA (97.3%), *Rhodococcus* sp. P7 (97.3), *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T (96.7%), *Terrabacter* sp. YK3 (96.7%) and also two dioxin and/or dibenzofuran *Rhodococcus opacus* SAO101 (94%), *Rhodococcus* sp. YK2 (94%). Based on morphological characteristics and analysis of 16S rRNA gene sequence, HDN3 strain should be placed in genus *Rhodococcus* and named *Rhodococcus* sp. HDN3. A part of gene encoded angular dioxygenase were amplified from total DNA of HDN3 strain by using primer pair DIOXY-F and DIOXY-R, and showed high similar levels 99% to *dfdA* gene in *Terrabacter* sp. DBF63 and *Rhodococcus* sp. YK2. All of these Gram-positive bacterial strains are able degrade dibenzofuran.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 17 tháng 1 năm 2007

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.