

VI KHUẨN PHÂN HỦY 2,4-D TRONG ĐẤT LÚA Ở TIỀN GIANG VÀ SÓC TRĂNG

Nguyễn Thị Phi Oanh¹, Hứa Văn Ủ¹ và Dirk Springael²

ABSTRACT

Thirty-two bacterial isolates capable of degrading 2,4-D were isolated from rice fields in Tien Giang and Soc Trang. Based on Box-PCR genomic fingerprinting, these isolates represented ten different strains. 16S-rRNA gene sequencing showed that all strains were β -Proteobacteria, Burkholderiales, Burkholderiaceae and were identified as *Cupriavidus* sp. ST1, *Burkholderia* sp. ST4, *Cupriavidus* sp. ST7, *Cupriavidus* sp. ST10, *Burkholderia* sp. ST14, *Cupriavidus* sp. TG2, *Cupriavidus* sp. TG3, *Cupriavidus* sp. TG16, *Ralstonia* sp. TG26, and *Burkholderia* sp. TG27. In mineral salt medium supplemented with 2,4-D (500mg.l⁻¹) as a sole carbon source, HPLC analysis indicated that *Cupriavidus* sp. TG2 was the most active 2,4-D degrader.

Keywords: 2,4-D, isolation, Box-PCR, 16S-rRNA gene, high performance liquid chromatography, biodegradation, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Burkholderia*

Title: 2,4-D degrading bacteria in rice fields in Tien Giang and Soc Trang

TÓM TẮT

Ba mươi hai dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D được phân lập trong đất lúa ở Tiền Giang và Sóc Trăng. Phổ điện di sản phẩm Box-PCR chứng tỏ chúng thuộc mười dòng vi khuẩn khác nhau. Kết quả giải trình tự gen 16S-rRNA cho thấy các dòng vi khuẩn đều thuộc lớp β -Proteobacteria, bộ Burkholderiales, họ Burkholderiaceae và được định danh lần lượt là *Cupriavidus* sp. ST1, *Burkholderia* sp. ST4, *Cupriavidus* sp. ST7, *Cupriavidus* sp. ST10, *Burkholderia* sp. ST14, *Cupriavidus* sp. TG2, *Cupriavidus* sp. TG3, *Cupriavidus* sp. TG16, *Ralstonia* sp. TG26, và *Burkholderia* sp. TG27. Trong môi trường tối thiểu có bổ sung 2,4-D (500mg.l⁻¹) như là nguồn carbon duy nhất, kết quả phân tích sắc ký lỏng cao áp cho thấy dòng *Cupriavidus* sp. TG2 có khả năng phân hủy 2,4-D nhanh nhất.

Từ khóa: 2,4-D, phân lập, Box-PCR, gen 16S-rRNA, sắc ký lỏng cao áp, sự phân hủy sinh học, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Burkholderia*

1 GIỚI THIỆU

Nông dược (thuốc bảo vệ thực vật) đóng vai trò quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Số liệu thống kê năm 1996 cho thấy hàng năm Việt Nam đã sử dụng hơn 30.000 tấn thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) (FAO, 2004). Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) được xem là vựa lúa lớn nhất nước, cung cấp hơn 50% sản lượng lúa cho cả nước (Dung và Dung, 1997). Nhằm đáp ứng nhu cầu lương thực và xuất khẩu, quá trình thâm canh tăng năng suất cũng dẫn đến gia tăng nhu cầu sử dụng nông dược. Bên cạnh vai trò phòng trừ sâu, bệnh và cỏ dại, thuốc BVTV cũng trực tiếp hoặc gián tiếp ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe con người.

¹ Bộ môn Sinh Học, Khoa Khoa Học Tự Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

² Division of Soil and Water Management, Department of Earth and Environmental Sciences, Faculty of Bioscience Engineering, Katholic University of Leuven, Belgium

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) là thuốc trừ cỏ nội hấp, có chọn lọc, trừ cỏ hậu nảy mầm. Thời gian bán hủy của 2,4-D tương đối dài: 59,3 ngày trong đất, 66 ngày trong không khí và 39 ngày trong nước (EPA, 1988). Trong đất, 2,4-D có thể bị phân hủy bởi một số vi sinh vật như *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Halomonas*, *Pseudomonas* (Huong *et al.*, 2007) và *Sphingomonas chungbukensis* (Huong *et al.*, 2008). Hiện nay, 2,4-D vẫn được nông dân ĐBSCL sử dụng rộng rãi để trừ cỏ lá rộng trên ruộng lúa. Mục tiêu của đề tài là phân lập và định danh các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D trong đất lúa ở Tiền Giang và Sóc Trăng đồng thời khảo sát khả năng phân hủy 2,4-D của chúng trong điều kiện phòng thí nghiệm.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Thu mẫu đất

Các mẫu đất mặt (sâu 20 cm) được thu từ các ruộng lúa ở huyện Cai Lậy, Tiền Giang (TG) và Phường 8, Sóc Trăng (ST). Các ruộng này đã và đang được sử dụng 2,4-D để diệt cỏ ở giai đoạn 10 đến 15 ngày sau sạ hoặc 7 đến 10 ngày sau cấy với liều lượng từ 1,2 đến 2 lít.ha⁻¹. Vị trí thu mẫu được định vị bằng GPSV, Garmin, USA với kinh độ tương ứng là 0624017 và 0610044 và vĩ độ tương ứng là: 1146888 và 1062834 theo hệ qui chiếu UTM, mảnh số 48P.

2.2 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D

Vi khuẩn phân hủy 2,4-D được phân lập theo phương pháp chọn lọc trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung nguồn carbon là 2,4-D 500mg.l⁻¹. Cho 5g mỗi mẫu đất vào bình tam giác chứa 25 ml môi trường tối thiểu có bổ sung 2,4-D. Các mẫu đất được lắc 125 vòng.phút⁻¹ ở nhiệt độ phòng trong hai tuần. Ở lần chọn lọc ba, dung dịch vi khuẩn được pha loãng, cấy lên môi trường tối thiểu đặc có bổ sung 2,4-D và ủ ở 30°C trong 3 ngày. Chọn từng khuẩn lạc và cấy lên môi trường có và không bổ sung 2,4-D. Bước này được lặp lại nhiều lần cho đến khi chọn được các khuẩn lạc phát triển trên môi trường có bổ sung 2,4-D và không phát triển trên môi trường không bổ sung 2,4-D.

2.3 Box-PCR

ADN của các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D được khuếch đại bằng phản ứng Box-PCR. Thành phần của một phản ứng Box-PCR 50µl gồm 5µl PCR buffer 10X, 3µl MgCl₂ 25mM, 0,8µl BSA1%, 2,5µl dNTPs (2,5mM mỗi loại), 0,85µl mỗi BoxA1R (0,1mM) (CTACGGCAAGGCGACGCTG ACG, Koeuth *et al.*, 2008), 5µl DMSO 100%, 0,5µl Taq DNA polymerase (5U.µl⁻¹) và 15ng ADN. Chương trình nhiệt độ và thời gian của phản ứng bao gồm: biến tính sơ khởi ở 95°C trong 2 phút; 35 chu kỳ khuếch đại gồm 94°C trong 3 giây, 92°C trong 30 giây, 50°C trong 1 phút, 65°C trong 8 phút; và kéo dài hoàn tất ở 65°C trong 8 phút (Breugelmans *et al.*, 2004). Sản phẩm Box-PCR được phân tích trên gel agarose 1,5% với dòng điện 90V trong 6 giờ.

2.4 Định danh vi khuẩn dựa trên trình tự ADN của gen 16S-rRNA

Sử dụng cặp môi tổng quát GC-63F (CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC, El Fantroussi *et al.*,

1999; Moreels *et al.*, 2004) và 518R (ATTACCGCGGCT GCTGG, El Fantroussi *et al.*, 1999; Moreels *et al.*, 2004) để khuếch đại gen 16S-rRNA của các dòng vi khuẩn. Thành phần của một phản ứng PCR 100µl gồm 10µl PCR buffer 10X, 10µl BSA1%, 8µl dNTPs (2,5mM mỗi loại), 0,5µl mỗi loại mồi (0,1mM), 0,5µl Taq DNA polymerase (5U.µl⁻¹) và 15ng ADN. Chương trình nhiệt độ và thời gian của phản ứng bao gồm: biến tính sơ khởi ở 95°C trong 5 phút; 40 chu kỳ khuếch đại gồm 95°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút, 65°C trong 1 phút; và kéo dài hoàn tất ở 65°C trong 5 phút (Breugelmans *et al.*, 2004). Gen 16S-rRNA sau khi khuếch đại được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% với dòng điện 90V trong 45 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR Purification Kit, QIAquick®, Qiagen và giải trình tự bằng 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystem. Trình tự ADN của gen 16S-rRNA được phân tích bằng Sequence scanner v1.0 và so sánh với các trình tự nucleotide của gen tương ứng của vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu bằng BlastN ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

2.5 Khảo sát khả năng phân hủy 2,4-D của vi khuẩn bằng sắc ký lỏng cao áp

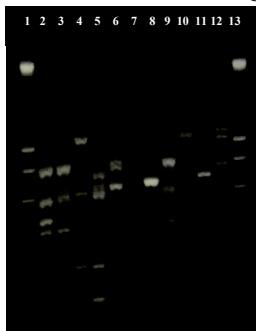
Chung một khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn vào 2ml môi trường tối thiểu có bổ sung 2,4-D với nồng độ 500mg.l⁻¹ như là nguồn carbon duy nhất. Sau 24 giờ, đo OD của từng mẫu vi khuẩn ở bước sóng 600nm và pha loãng các mẫu vi khuẩn để chúng có cùng sinh khối. Chung 30µl từng dịch nuôi vi khuẩn vào 5ml môi trường tối thiểu có bổ sung 2,4-D. Các mẫu nuôi cấy được thông khí bằng cách lắc với tốc độ 125 vòng.phút⁻¹ ở nhiệt độ phòng. Khả năng phân hủy 2,4-D của vi khuẩn được khảo sát sau mỗi 4 giờ. Mẫu nuôi cấy được ly tâm 12.000 vòng.phút⁻¹ trong 5 phút. Loại bỏ kết tủa, 2,4-D trong dung dịch được đo bằng sắc ký lỏng cao áp ở bước sóng 228 nm khi được bơm qua cột sắc ký C₁₈ với tốc độ dòng 1ml.phút⁻¹ và thời gian lưu 5 phút. Thành phần của pha động gồm acetonitrile và KH₂PO₄ 50mM theo tỉ lệ 50:50.

3 KẾT QUẢ

3.1 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D

Ba mươi hai dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D được phân lập trên đất lúa ở Tiền Giang và Sóc Trăng trong đó Sóc Trăng có 12 dòng và Tiền Giang có 20 dòng. Khi được nuôi cấy trên môi trường TSA, các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, trắng đục (24 dòng) hoặc trắng trong (8 dòng), kích thước từ nhỏ hơn 1 mm đến 2 mm sau 2 ngày nuôi cấy.

3.2 So sánh các dòng vi khuẩn bằng Box-PCR



Phổ điện di sản phẩm Box-PCR để so sánh sự khác biệt di truyền về thành phần các đoạn ADN hiện diện giữa các đoạn boxA ở 32 dòng vi khuẩn cho thấy 12 dòng được phân lập ở Sóc Trăng thuộc 5 dòng khác nhau gồm ST1, ST4, ST7, ST10 và ST14. 20 dòng được phân lập ở Tiền Giang thuộc 5 dòng khác nhau gồm ST1, ST4, ST7, ST10 và ST14 (Hình 1).

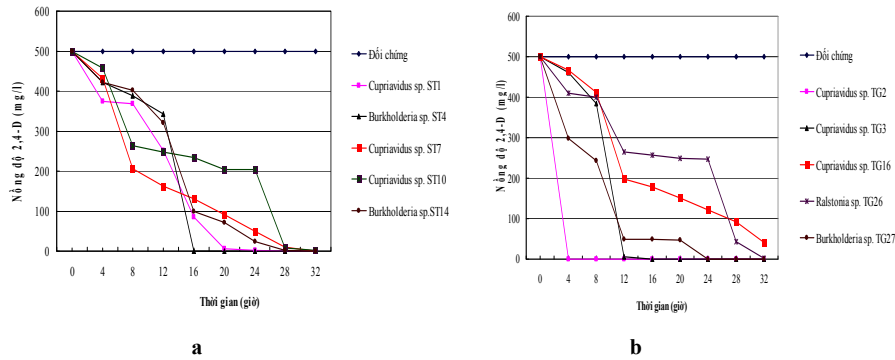
Hình 1: Phổ điện di sản phẩm Box-PCR của mười dòng vi khuẩn 1 và 13: thang chuẩn; 2: ST1; 3: ST4; 4: ST7; 5: ST10; 6: ST14; 8: TG2; 9: TG3; 10: TG16; 11: TG26; 12: TG27

3.3 Định danh vi khuẩn dựa trên trình tự ADN của gen 16S-rRNA

Trình tự nucleotide của gen 16S-rRNA cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D thuộc ba giống *Cupriavidus*, *Burkholderia* và *Ralstonia* trong đó Sóc Trăng có ba dòng thuộc giống *Cupriavidus*, hai dòng thuộc giống *Burkholderia* và Tiền Giang có ba dòng thuộc giống *Cupriavidus*, một dòng thuộc giống *Burkholderia* và một dòng thuộc giống *Ralstonia*. Các dòng vi khuẩn được định danh lần lượt là *Cupriavidus* sp. ST1, *Burkholderia* sp. ST4, *Cupriavidus* sp. ST7, *Cupriavidus* sp. ST10, *Burkholderia* sp. ST14, *Cupriavidus* sp. TG2, *Cupriavidus* sp. TG3, *Cupriavidus* sp. TG16, *Ralstonia* sp. TG26, và *Burkholderia* sp. TG27. Các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D đều thuộc lớp β -*Proteobacteria*, bộ Burkholderiales, họ Burkholderiaceae. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Top *et al.* 1995 và Itoh *et al.* 2004, các dòng vi khuẩn phân hủy 2,4-D thuộc lớp β -*Proteobacteria*. Hơn nữa, sự khác nhau về mặt di truyền trên phổ điện di sản phẩm Box-PCR của các dòng vi khuẩn được phân lập trong đất lúa ở Tiền Giang và Sóc Trăng cho thấy ở hai vùng địa lý khác nhau hiện diện hai quần thể vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D không giống nhau (Hình 1). Vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D thuộc các giống *Cupriavidus*, *Burkholderia* và *Ralstonia* có thể được phân lập từ các vùng địa lý khác nhau. Ở Việt Nam, Huang *et al.* (2007) đã phân lập được các giống vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D và 2,4,5-T như *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, và *Nocardioideis* trong các mẫu đất ở miền Bắc, Trung đến Đông Nam Bộ. Dòng *Cupriavidus* sp. TFD38 được phân lập ở Mỹ và dòng *Ralstonia eutropha* JMP134 được tìm thấy ở Úc (Baelum *et al.*, 2010).

3.4 Khả năng phân hủy 2,4-D của vi khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm

Trong các dòng vi khuẩn phân lập ở Sóc Trăng, dòng *Burkholderia* sp. ST4 đã phân hủy gần như hoàn toàn 500mg.l⁻¹ 2,4-D sau 16 giờ. Thời gian phân hủy 2,4-D của dòng *Cupriavidus* sp. ST1 và *Burkholderia* sp. ST14 tương ứng là 24 giờ và 28 giờ. Dòng *Cupriavidus* sp. ST7 và *Cupriavidus* sp. ST10 phân hủy gần như hoàn toàn 2,4-D sau 32 giờ nuôi cấy (Hình 2a). Trong các dòng vi khuẩn phân lập ở Tiền Giang, dòng *Cupriavidus* sp. TG2 phân hủy gần như hoàn toàn lượng 2,4-D sau 4 giờ. Thời gian phân hủy 2,4-D của các dòng *Cupriavidus* sp. TG3, *Cupriavidus* sp. TG27 và *Ralstonia* sp. TG26 lần lượt là 12 giờ, 24 giờ và 32 giờ. Dòng *Cupriavidus* sp. TG16 chỉ phân hủy 91,60% lượng 2,4-D sau 32 giờ nuôi cấy (Hình 2b). Như vậy, trong các dòng vi khuẩn đã phân lập trong đất lúa ở Sóc Trăng và Tiền Giang, dòng *Cupriavidus* sp. TG2 phân hủy 2,4-D nhanh nhất. Khả năng phân hủy 2,4-D của các dòng vi khuẩn còn lại giảm dần theo thứ tự *Cupriavidus* sp. TG3, *Burkholderia* sp. ST4, *Burkholderia* sp. TG27, *Cupriavidus* sp. ST1, *Burkholderia* sp. ST14, *Cupriavidus* sp. ST7, *Cupriavidus* sp. ST10, *Ralstonia* sp. TG26 và *Cupriavidus* sp. TG16.



Hình 2: Khả năng phân hủy 2,4-D của vi khuẩn theo thời gian

a. Sóc Trăng, b. Tiền Giang

Theo Ngô Tự Thành *et al.* (2003), dòng vi khuẩn *Azotobacter* sp. 86.2 được phân lập từ đất trồng rau đã phân hủy 72,3mg.l⁻¹ 2,4-D sau 24 giờ khi được nuôi trong môi trường Burk có bổ sung 200mg.l⁻¹ 2,4-D và 10 g.l⁻¹ glucose. Mặc dù được bổ sung nguồn carbon khác là glucose, khả năng phân hủy 2,4-D của dòng 86.2 vẫn thấp hơn khả năng phân hủy 2,4-D của các dòng vi khuẩn chúng tôi đã phân lập trong đất lúa ở Tiền Giang và Sóc Trăng. Theo Maltseva *et al.* (1996), dòng vi khuẩn I-18 được phân lập từ nước bị nhiễm chất thải trong quá trình sản xuất 2,4-D ở hồ Alkali, tây nam Oregon, Canada đã phân hủy 3000mg 2,4-D.l⁻¹ trong 72 giờ, cao hơn rất nhiều so với khả năng phân hủy 2,4-D của các dòng vi khuẩn chúng tôi đã phân lập. Như vậy sự khác biệt về khả năng phân hủy 2,4-D của các dòng vi khuẩn được phân lập từ các vùng địa lý khác nhau có lẽ tùy thuộc vào áp lực chọn lọc, nghĩa là thời gian, tần số và lượng 2,4-D đã được tiếp xúc cũng như các yếu tố môi trường như nhiệt độ, pH, thành phần chất hữu cơ trong đất,...

4 KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất lúa ở Tiền Giang và Sóc Trăng, chúng tôi đã phân lập được ba mươi hai dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy 2,4-D. Kết quả điện di sản phẩm Box-PCR cho thấy chúng thuộc mười dòng khác nhau, trong đó năm dòng được phân lập ở Sóc Trăng và năm dòng được phân lập ở Tiền Giang. Các dòng vi khuẩn đều thuộc lớp *β-Proteobacteria*, bộ *Burkholderiales*, họ *Burkholderiaceae* và được định danh lần lượt là *Cupriavidus* sp. ST1, *Burkholderia* sp. ST4, *Cupriavidus* sp. ST7, *Cupriavidus* sp. ST10, *Burkholderia* sp. ST14, *Cupriavidus* sp. TG2, *Cupriavidus* sp. TG3, *Cupriavidus* sp. TG16, *Ralstonia* sp. TG26, và *Burkholderia* sp. TG27. Khi nuôi cấy trong môi trường tối thiểu có bổ sung 2,4-D (500mg.l⁻¹) như là nguồn carbon duy nhất, dòng *Cupriavidus* sp. TG2 có khả năng phân hủy 2,4-D nhanh nhất, kể đến là các dòng *Cupriavidus* sp. TG3, *Burkholderia* sp. ST4, *Burkholderia* sp. TG27, *Cupriavidus* sp. ST1, *Burkholderia* sp. ST14, *Cupriavidus* sp. ST7, *Cupriavidus* sp. ST10, *Ralstonia* sp. TG26 và *Cupriavidus* sp. TG16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baelum, J., C. S. Jacobsen, and W. E. Holben (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(2), pp. 67-70.
- Breugelmans, P., and M. Uyttendaele (2004) Protocol for DNA extraction and purification. Laboratory of soil and water management, KULeuven, Belgium.
- Dung, N. H., and Dung, T.T.T. (1997) Economic and health consequences of pesticide use in paddy production in the Mekong delta, Vietnam. Research report. International Development Research Centre, Ottawa, Canada; <http://www.idrc.ca/uploads/userS/10536137480ACF124.pdf>
- El Fantroussi, S., L. Verschuere, W. Verstraete, and E. M. Top (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles, *Appl Environ Microbiol*, 65, pp. 982-988.
- Environmental Protection Agency (1988) Pesticide Fact Sheet, 94(2).
- FAO (2004). FAO-STAT, Statistics downloaded for Vietnam; <http://apps.fao.org/default.jsp>.
- Huong, N. L., K. Itoh, and K. Suyama (2007) Diversity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)- degrading bacterial in Vietnamese soil, *Microbes and Environments*, 23(3), pp. 243-256.
- Huong, N.L., K. Itoh, and K. Suyama (2008) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading bacterial community in soil-water suspension during the enrichment process, *Microbes and Environments*, 23(2), pp. 142-148.
- Itoh, K., Y. Tashiro, K. Uobe, Y. Kamagata, K. Suyama, and H. Yamamoto (2004) Root nodule *Bradyrhizobium* spp. harbor *tfdAa* and *cadA*, homologous with gene encoding 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid degrading protein, *Appl Environ Microbiol*, 70, pp. 2110-2118.
- Koeuth, T., J. Versaalovic, and R. Lupski (2008) Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* Box elements in diverse bacteria, *Genome Research*, pp. 408-418.
- Maltseva, O., C. McGowan, R. Fulthorpe, and P. Oriel (1996) Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria, *Microbiol*, 142, pp. 1115-1122.
- Moreels, D., L. Bastiaens, F. Ollevier, R. Merckx, L. Diels, and D. Springael (2004) Evaluation of the intrinsic methyl tert-butyl ether (MTBE) biodegradation potential of hydrocarbon contaminated subsurface soils in batch microcosm systems, *FEMS Microbiol Ecol*, 49, pp. 121-128.
- Ngô Tự Thành, Vũ Thị Minh Đức, Nguyễn Thu Hà và Nguyễn Ngọc Quyên (2003) Đặc tính sinh học của một số chủng *Azotobacter*, *Tạp chí di truyền học và ứng dụng*, 4.
- Top, E. M., W. E. Holben, and L. J. Forney (1995) Characterization of diverse 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmids isolated from soil by complementation, *Appl and Environ Microbiol*, 61(5), pp. 1691-1698.
- [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)