

PHÂN TÍCH DI TRUYỀN KHẢ NĂNG DI CHUYỂN THEO PHENANTHRENE CỦA VI KHUẨN *Pseudomonas stutzeri* E1

Nguyễn Thị Phi Oanh¹, Line Nielsen², Paulina Estrada de los Santos³, René De Mot³ và Dirk Springael²

ABSTRACT

Pseudomonas stutzeri strain E1 shows a two-time accelerated swarming behavior in minimal medium with sprayed phenanthrene in swimming assays and a five-time higher chemotaxis towards dissolved phenanthrene in capillary assays. A mutant bank of strain E1 was constructed using the pTnMod-OGm plasmid mutagenesis system. 82 out of 2639 electroporants screened showed an altered phenotype of phenanthrene-driven motility and/or phenanthrene degradation. 16 representative mutants were selected for sequencing the genes flanking the plasmid insertion. Mutations in *flhA* resulted in abolished swimming and swarming phenotype, and in *flgK* resulted in abolished swimming and diminished swarming phenotype. A mutation in *cheY* performed abolished swimming and reduced swarming activity while a *gidA* mutation resulted in decreased phenanthrene degradation and both decreased swimming and swarming behavior. A mutation in gene encoding a Zn dependent protease and in a gene encoding capsular polysaccharide biosynthesis protein resulted in abolished swarming suggesting that these proteins also play a potential role in the swarming activity of *P. stutzeri* E1.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri*, polycyclic aromatic hydrocarbon, phenanthrene, chemotaxis, plasmid pTnMod-OGm, swimming, swarming

Title: Genetic analysis of phenanthrene-driven motility by the phenanthrene-degrading soil isolate *Pseudomonas stutzeri* E1

TÓM TẮT

Pseudomonas stutzeri dòng E1 có khả năng di chuyển bề mặt tăng gấp đôi khi nuôi trong môi trường tối thiểu được phủ phenanthrene. Thí nghiệm mao dẫn cũng cho thấy E1 di chuyển nhanh gấp năm lần về hướng có phenanthrene. Plasmid pTnMod-OGm được dùng để tạo thư viện đột biến dòng E1. Trong số 2639 đột biến đã khảo sát, 82 đột biến biểu hiện những thay đổi về khả năng di chuyển theo phenanthrene và/hoặc phân hủy phenanthrene. 16 đột biến được chọn để giải trình tự của các gen đột biến tương ứng. Đột biến gen *flhA* làm E1 mất khả năng bơi và di chuyển bề mặt, đột biến gen *flgK* làm mất khả năng bơi và giảm khả năng di chuyển bề mặt của E1. Đột biến gen *cheY* làm mất khả năng bơi và giảm khả năng di chuyển bề mặt trong khi đột biến gen *gidA* làm giảm khả năng phân hủy phenanthrene và giảm cả khả năng bơi và di chuyển bề mặt của E1. Đột biến gen tổng hợp protein Zn-dependent protease và gen tổng hợp vỏ polysaccharide làm cho E1 mất khả năng di chuyển bề mặt chứng tỏ các protein này cũng giữ vai trò tiềm năng trong hoạt động di chuyển bề mặt của *P. stutzeri* E1.

Từ khoá: *Pseudomonas stutzeri*, hydrocarbon đa vòng thơm, phenanthrene, hóa hướng động, plasmid pTnMod-OGm, bơi, di chuyển bề mặt

1 GIỚI THIỆU

Các hydrocarbon đa vòng thơm (polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs) là thành phần tự nhiên trong các nhiên liệu hóa thạch và được tạo ra do sự đốt cháy

¹ Bộ môn Sinh Học, Khoa Khoa Học, Đại Học Cần Thơ

² Division of Soil and Water Management, Department of Land Management and Economics, Faculty of Bioscience Engineering, KU Leuven, Belgium

³ Centre of Microbial and Plant Genetics, Department of Microbial and Molecular Systems, Faculty of Bioscience Engineering, KU Leuven, Belgium

không hoàn toàn các vật liệu hữu cơ. PAHs có thể khuếch tán vào môi trường chủ yếu từ các phương tiện giao thông qua quá trình đốt cháy xăng dầu (Kanaly & Harayama, 2000). Sự ô nhiễm PAHs tại chỗ có thể do chảy rửa dầu hoặc các hoạt động công nghiệp như sản xuất khí đốt, bảo quản gỗ và hóa dầu (Cerniglia, 1992). Nhiều PAHs và các dạng oxi hóa của chúng rất độc có thể gây đột biến và ung thư (Samata *et al.*, 2002). Trong đất, vi sinh vật có vai trò chính trong quá trình phân hủy PAHs (Bastiaens *et al.*, 2000). Vi khuẩn *Pseudomonas*, *Sphingomonas* và *Mycobacterium* được xem là những vi sinh vật phân hủy PAHs quan trọng nhất trong đất bị ô nhiễm (Uyttebroek, 2005). Tuy nhiên, PAHs lưu tồn trong hệ sinh thái do chúng ít tan trong nước và bám vào các phân tử chất rắn làm cho vi sinh vật rất khó tiếp xúc và phân hủy (Habe & Omori, 2003).

Các chất ô nhiễm như PAHs thường không phân bố đều trong đất. Khả năng di chuyển theo các chất ô nhiễm (hóa hướng động) có lẽ là một đặc tính thuận lợi của các vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất này. Hóa hướng động giúp vi sinh vật có thể phát hiện và di chuyển về các nguồn ô nhiễm trong đất (Grimm & Harwood, 1997). Thật vậy, các vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ khác nhau cũng thể hiện khả năng hóa hướng động theo các chất ô nhiễm như hydrocarbon một vòng và đa vòng, alkan, nitroaromatics, và các thuốc trừ sâu gốc chlor (Pandey & Jain, 2002).

Các nghiên cứu hiện nay cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy PAHs như *P. stutzeri* E1, *Pseudomonas* sp. E7 và *Novosphingobium subarcticum* E6, (Bijdekerke, 2004; Sniegowski, 2005) cũng thể hiện khả năng hóa hướng động với phenanthrene. Tuy nhiên, cơ chế di truyền liên quan chưa được nghiên cứu.

Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát cơ chế di truyền của khả năng hóa hướng động theo phenanthrene ở *P. stutzeri* E1 bằng cách sử dụng plasposon *pTnMod-OGm* để tạo thư viện đột biến. Các đột biến sau đó được chọn lọc bao gồm các dạng bị ảnh hưởng khả năng bơi và/hoặc di chuyển bề mặt, và/hoặc phân hủy phenanthrene. Một số đột biến đại diện về các kiểu hình trên được giải trình tự để xác định các gen liên quan đến các chức năng này.

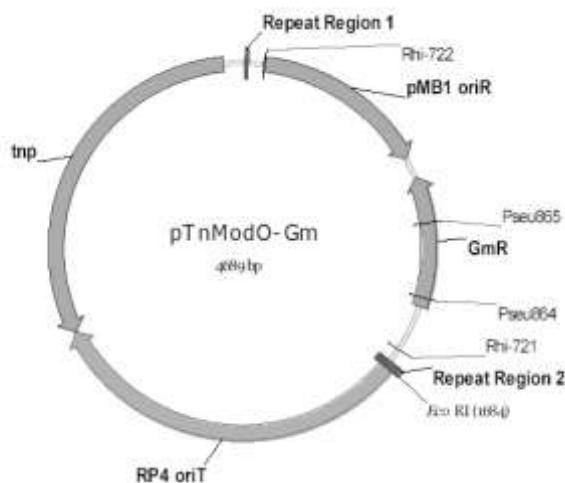
2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Các dòng vi khuẩn và plasmid

P. stutzeri E1 đã được phân lập từ đất bị ô nhiễm PAHs có khả năng di chuyển theo phenanthrene (Bijdekerke, 2004; Sniegowski, 2005) được nuôi trong môi trường tối thiểu có phenanthrene hoặc môi trường Trypticase Soy Broth (TSB). *Escherichia coli* GM2163 được nuôi trong môi trường Luria-Bertani Broth (LB).

Plasposon là một mini-Tn5 transposon có sửa đổi và được dùng để gây đột biến ở vi khuẩn Gram âm (Dennis & Zylstra, 1998). Đặc trưng của plasposon là chúng được thiết kế để có thể phục hồi kiểu hình đột biến và giải trình tự ADN ở hai phía plasposon đã chèn vào (Leveau *et al.*, 2006). Plasposon bao gồm điểm khởi đầu sao chép (*oriR*), điểm khởi đầu trao đổi (*oriT*), các gen kháng kháng sinh và gen Tn5 transposase (*tnp*) (Dennis & Zylstra, 1998).

Trong nghiên cứu này, pTnMod-OGm mang gen kháng gentamicin (Dennis & Zylstra, 1998) (Hình 1) được biến nạp vào tế bào cảm biến của E1 để tạo thư viện đột biến.



Hình 1: Sơ đồ của pTnMod-OGm (Dennis & Zylstra, 1998)

trp: transposase. *pMB1oriR*: điểm khởi đầu sao chép. *Gm^R*: gen kháng gentamicin. *RP4 oriT*: điểm khởi đầu trao đổi. *EcoRI*: điểm cắt giới hạn của *EcoRI*. Các primer *Pseu864* và *Pseu865* (*P. Estrada de los Santos*, chưa xuất bản), *Rhi-721* và *Rhi-722* (Dennis & Zylstra, 1998) hướng vào và hướng ra các đoạn repeat region, theo thứ tự.

2.2 Tạo thư viện đột biến bằng plasposon

2.2.1 Biến nạp bằng điện (Electrotransformation)

Plasposon *pTnMod-OGm* được trích từ *E. coli* GM2163 bằng Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit, Invitex. Các tế bào dạng hoang dại của *P. stutzeri* E1 được rửa nhiều lần bằng magnesium electroporation buffer (MEB) lạnh để tạo tế bào cảm biến (Dennis & Sokol, 1995). *pTnMod-OGm* được biến nạp bằng điện (2,5kV, 25µF và 200Ω) vào các tế bào cảm biến của E1 (theo BioRad). ADN genome của 10 đột biến ngẫu nhiên và dạng hoang dại được ly trích bằng Puregene DNA Purification Kit, Gentra và sau đó lai bằng phương pháp Southern Blot để kiểm tra sự biến nạp ngẫu nhiên của plasposon vào E1.

2.2.2 Chọn lọc đột biến

Các đột biến được nuôi trong môi trường TSA (TSB có agar) được phủ 0.2% phenanthrene để cảm ứng khả năng phân hủy và hóa hướng động với phenanthrene. Các microtiter plate 12 giếng (Greiner Bio-one) được sử dụng để chọn lọc các đột biến bị ảnh hưởng khả năng di chuyển theo và phân hủy phenanthrene. Các đột biến đại diện được nuôi cấy và khẳng định kiểu hình trong các đĩa Petri. Khả năng phân hủy phenanthrene của các đột biến này cũng được theo dõi khi nuôi trên môi trường tối thiểu có bổ sung phenanthrene.

2.2.3 Phân tích trình tự

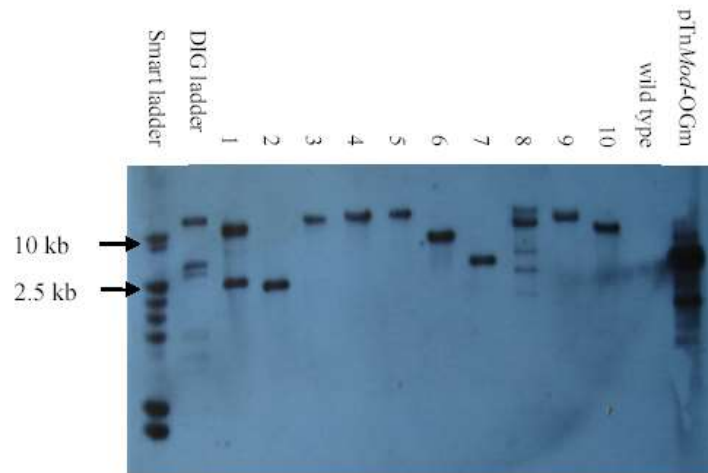
Trình tự gen của các đột biến ở hai phía nơi plasposon đã gắn vào được phân tích nhờ các primer *Rhi-721* và *Rhi-722* (Dennis & Zylstra, 1998) (Hình 1). ADN genome của các đột biến được trích và chuẩn bị theo ABI PRISM BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Applera). Trình tự ADN được giải bằng ABI PRISM 3100-AvantGeneticAnalyzer (Applied Biosystems, Applera) và phân tích theo phần mềm Sequence Analysis 3.7. Sự tương đồng của các trình tự ADN và protein

được so với cơ sở dữ liệu của Trung Tâm Quốc Gia về Thông Tin Công Nghệ Sinh Học (National Center for Biotechnology Information: NCBI) bằng BlastN và BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tạo thư viện đột biến bằng plasposon ở *P. stutzeri* E1

Kết quả phân tích Southern blot cho thấy *TnMod-OGm* đã gắn ngẫu nhiên vào các vị trí khác nhau trên ADN của từng đột biến (Hình 2).



Hình 2: Phân tích Southern blot của 10 đột biến ngẫu nhiên (1-10), wild type: hoang dại

3.2 Chọn lọc đột biến

82 trong số 2639 đột biến được khảo sát trong các microtiter plate 12 giếng cho thấy có sự thay đổi về khả năng hóa hướng động với và/hoặc phân hủy phenanthrene. Tùy vào cách di chuyển, bơi trong agar hoặc di chuyển bề mặt và phân hủy phenanthrene, các đột biến được xếp vào các nhóm: tăng, giảm hoặc mất khả năng di chuyển bề mặt và/hoặc bơi, và giảm khả năng phân hủy phenanthrene so với dạng hoang dại (Bảng 1).

P. stutzeri E1 có khả năng di chuyển bề mặt nhanh gấp đôi khi nuôi trong môi trường tối thiểu có phủ phenanthrene so với đối chứng, thí nghiệm mao dẫn cũng chứng minh E1 di chuyển về hướng có phenanthrene hòa tan nhanh gấp năm lần so với đối chứng (Fredslund, trao đổi cá nhân). Ở nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy ngay cả trong môi trường giàu dinh dưỡng như TSA có phủ phenanthrene, E1 vẫn thể hiện khả năng di chuyển bề mặt theo phenanthrene. Kết quả quan sát cho thấy E1 có hai hình thức di chuyển: bơi trong agar và di chuyển trên bề mặt agar, đồng thời di chuyển theo phenanthrene là đặc tính vốn có của *P. stutzeri* E1.

Các đột biến bị mất khả năng bơi sẽ ảnh hưởng đến hoạt động di chuyển bề mặt. Các đột biến mất khả năng bơi sẽ giảm hoặc mất hẳn khả năng di chuyển bề mặt như đột biến 25A8, 5A10 và 19A7. Thật vậy, ở *E. coli* và *Samonella typhimurium*, phức hệ chiên mao dùng cho hoạt động bơi và khả năng hóa hướng động rất cần thiết cho hoạt động di chuyển bề mặt (Harshey & Matsuyama, 1994). Hơn nữa, đột biến 5H5 bị giảm khả năng bơi cũng mất khả năng di chuyển bề mặt. Tuy nhiên ở các đột biến 11C3 và 28E9, khả năng di chuyển bề mặt không bị ảnh

hưởng khi khả năng bơi giảm. Như vậy, hoạt động bơi và di chuyển bề mặt theo phenanthrene ở E1 dường như có liên quan với nhau ở chừng mực nào đó.

Bảng 1: Kiểu hình của các đột biến đại diện khi nuôi cấy trong các microtiter plate 12 giếng với môi trường TSA (0.3% agar) có phủ phenanthrene

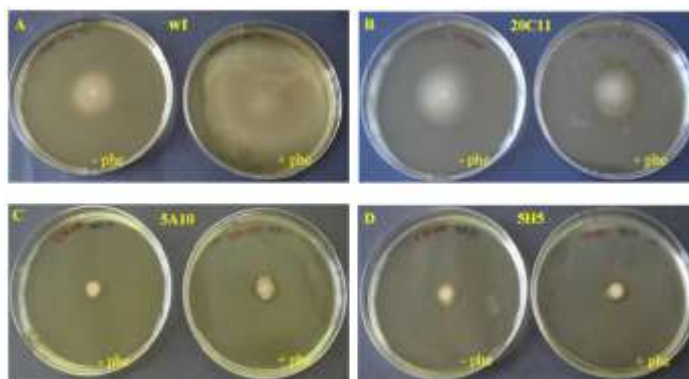
Vị trí trên microtiter plate	Kí hiệu	Khả năng	Di chuyển	Phân hủy	
Đĩa	Giếng	đột biến	bơi	bề mặt	phenanthrene
13	H10	13H10	↑	wt	wt
11	C3	11C3	↓	wt	wt
28	E9	28E9	↓	wt	wt
5	H5	5H5	↓	–	wt
24	G8	24G8	↓	↓	↓
25	A8	25A8	–	↓	wt
5	A10	5A10	–	↓	wt
19	A7	19A7	–	–	wt
20	C11	20C11	wt	↓	wt
24	A8	24A8	wt	↓	wt
3	F7	3F7	wt	–	wt
5	G11	5G11	wt	–	wt
13	B4	13B4	wt	–	wt
19	H9	19H9	wt	–	wt
20	E1	20E1	wt	–	wt
20	F10	20F10	wt	–	wt

↑: tăng khả năng bơi hoặc di chuyển bề mặt

↓: giảm khả năng bơi, di chuyển bề mặt hoặc phân hủy phenanthrene

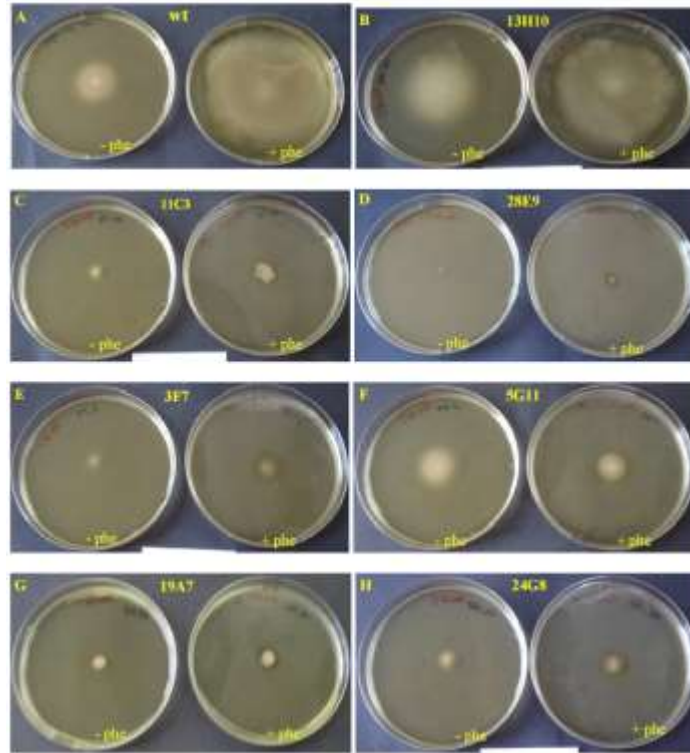
–: mất khả năng bơi hoặc di chuyển bề mặt

wt: kiểu hình hoang dại



Hình 3: Kiểu hình của các đột biến đại diện của E1 bị ảnh hưởng khả năng di chuyển theo phenanthrene so với dạng hoang dại. E1 được nuôi trong môi trường TSA (0,3% agar) có phủ (+ phe) hoặc không phủ phenanthrene (- phe) ở 25°C sau 3 ngày

A. hoang dại (wt), B. 20C11: giảm khả năng di chuyển bề mặt, C. 5A10: mất khả năng bơi và giảm khả năng di chuyển bề mặt, D. 5H5: giảm khả năng bơi và mất khả năng di chuyển bề mặt.



Hình 4: Kiểu hình của các đột biến đại diện của E1 bị ảnh hưởng khả năng di chuyển theo và phân hủy phenanthrene so với dạng hoang dại. E1 được nuôi trong môi trường TSA (0,3% agar) có phủ (+ phe) hoặc không phủ phenanthrene (- phe) ở 25°C sau 2 ngày

A. hoang dại (wt), B. 13H10: tăng khả năng bơi, C và D. 11C3 và 28E9: giảm khả năng bơi, E và F. 3F7 và 5G11: mất khả năng di chuyển bề mặt, G. 19A7: mất khả năng bơi và di chuyển bề mặt, H. 24G8: giảm khả năng phân hủy phenanthrene và giảm khả năng bơi và di chuyển bề mặt

Mặt khác, giảm hoặc mất khả năng di chuyển bề mặt không phải luôn luôn ảnh hưởng đến khả năng bơi. Các đột biến 20C11, 24A8, 13B4, 19H9, 20E1 và 20F10 bị giảm hoặc mất khả năng di chuyển bề mặt trong khi khả năng bơi không bị ảnh hưởng. Do vậy, các gen liên quan đến khả năng di chuyển bề mặt theo phenanthrene có lẽ ít nhiều khác với các gen tham gia vào hoạt động bơi ở E1.

Khả năng di chuyển theo và phân hủy phenanthrene của *P. stutzeri* E1 dường như có liên quan. Đột biến 24G8 giảm khả năng phân hủy phenanthrene cũng giảm khả năng bơi và di chuyển bề mặt. Tương tự, đột biến 22H9 giảm khả năng phân hủy phenanthrene cũng mất khả năng di chuyển bề mặt.

3.3 Phân tích trình tự

Trình tự ADN ở các đột biến đại diện của *P. stutzeri* E1 cho thấy TnMod-OGm đã gắn vào các gen tổng hợp các loại protein khác nhau. Hầu hết các đột biến có cùng kiểu hình mang plasposon ở các gen giải mã cho các protein không giống nhau (Bảng 2). Phần lớn các protein không liên quan trực tiếp đến khả năng di chuyển của vi khuẩn, chẳng hạn như two-component response regulator ở đột biến 13H10, AMP-binding enzyme ở đột biến 20C11, secreted protein containing DUF 541 ở đột biến 24A8, SbcC ở đột biến 3F7, prefoldin ở đột biến 19H9, FAD-dependent oxidoreductase ở đột biến 20E1, PA4523 ở đột biến 20F10, probable outer membrane protein precursor ở đột biến 11C3, allantoicase ở đột biến 28E9 và TrmH ở đột biến 5H5 (Bảng 2).

Tuy nhiên, trong vài trường hợp, dựa theo tài liệu, một số giả thuyết có thể đặt ra để giải thích mối liên quan của các protein này với khả năng bơi và di chuyển bề mặt của *P. stutzeri* E1. Sự bất hoạt về khả năng di chuyển bề mặt ở đột biến 5G11 là do TnMod-OGm chèn vào gen tổng hợp Zn-dependent protease, enzyme có chức năng cuộn protein với đầu N có trình tự giống với heat-shock protein HtpX ở vi khuẩn. Ở *Myxococcus xanthus*, protein tương tự HtpX cũng liên quan đến khả năng di chuyển bề mặt (Yang *et al.*, 1998). Đột biến 13B4 bị mất khả năng di chuyển bề mặt do đột biến xảy ra ở gen giải mã cho capsular polysaccharide biosynthesis protein (CPS). Ở *P. mirabilis*, CPS đóng vai trò quan trọng trong hoạt động di chuyển bề mặt do chúng làm trơn bề mặt môi trường. Các đột biến không có lớp polysaccharide có khả năng di chuyển giảm (Gygi *et al.*, 1995). Điều này cho thấy, ngoài chiên mao lớp polysaccharide cũng có chức năng trong hoạt động di chuyển bề mặt của E1. Gen *flhA* bị bất hoạt làm cho đột biến 19A7 mất cả khả năng bơi và di chuyển bề mặt. Thật vậy, *flhA* ở *Bacillus thuringiensis* bị đột biến làm cho chúng không thể tổng hợp chiên mao và do vậy mất khả năng di chuyển (Ghelardi *et al.*, 2002). Mặt khác, đột biến 5A10 mang gen *flgK* đột biến nên mất khả năng bơi và giảm khả năng di chuyển bề mặt. Ở *S. typhimurium*, HAP1 do *flgK* tổng hợp và HAP3 có chức năng liên kết các vùng trong của nơi dính chiên mao với các sợi (Ge *et al.*, 1997). Các kết quả này cho thấy hoạt động bơi và di chuyển bề mặt có liên hệ nhau và cả hai đều do chiên mao điều khiển. Do vậy, sự di chuyển bề mặt của E1 cũng là quá trình do chiên mao kiểm soát.

Đột biến 25A8 mang gen *cheY* bất hoạt làm mất khả năng bơi và giảm khả năng di chuyển bề mặt. Kết quả của chúng tôi mâu thuẫn với nghiên cứu trước đây, khi *cheY* ở *P. aeruginosa* bị đột biến, chúng vẫn di chuyển nhưng mất khả năng di chuyển bề mặt đồng thời mất khả năng hóa hướng động đối với peptone, methyl thiocyanate và phosphate (Masduki *et al.*, 1995). Đột biến ở gen *gidA* làm cho đột biến 24G8 giảm khả năng phân hủy phenanthrene, bơi và di chuyển bề mặt. Theo Kinscherf & Willis (2002), *gidA* có tính ổn định cao và hiện diện ở cả sinh vật sơ hạch và chân hạch chứng tỏ *gidA* liên quan đến một vài quá trình biến dưỡng chính của tế bào. Thật vậy, đột biến *gidA* ảnh hưởng đến nhiều tính trạng như tổng hợp kháng sinh, di chuyển bề mặt, ... do vậy *gidA* có lẽ liên quan đến cơ chế kiểm soát sau phiên mã.

4 KẾT LUẬN

Tạo đột biến bằng plasposon ở *P. stutzeri* E1 giúp xác định vài loại protein có lẽ liên quan đến khả năng di chuyển theo phenanthrene của E1 như Zn-dependent protease with chaperone function, capsular polysaccharide biosynthesis protein, FlhA, FlgK, CheY và GidA. Tuy nhiên, các gen qui định sự tổng hợp các protein này cần được giải trình tự của cả gen (open reading frame) cũng như các gen lân cận. Điều này có thể thực hiện bằng cách tận dụng đặc tính của plasposon, chúng cho phép phục hồi những đoạn ADN dài nằm ở hai phía nơi plasposon đã chèn vào.

Bảng 2: Kết quả BlastX của 16 đột biến đại diện bị ảnh hưởng khả năng di chuyển theo và phân hủy phenanthrene

Đột biến	Kiểu hình			Tương đồng		Identity [overlap]*	Genbank identifier
	Bơi	Di chuyển bề mặt	Phân hủy phenanthrene	Gen	Protein		
13H10	↑	wt	wt		Probable component regulator	two- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	64% [84] 15600359
11C3	↓	wt	wt		Probable membrane precursor	outer <i>P. aeruginosa</i> PAO1 protein	75% [109] 9949675
28E9	↓	wt	wt		Allantoicase	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP	71% [83] 67153769
5H5	↓	-	wt	<i>trmH</i>	RNA methyltransferase, group 1	<i>A. vinelandii</i> AvOP	80% [123] 67156542
24G8	↓	↓	↓	<i>gidA</i>	Glucose-inhibited division protein A	<i>P. syringae phaseolicola</i> 1448A	88% [124] 71554999
25A8	-	↓	wt	<i>cheY</i>	Response receiver	<i>P. syringae syringae</i> B728a	88% [78] 63257372
5A10	-	↓	wt	<i>flgK</i>	Flagellar associated protein 1	hook- <i>P. aeruginosa</i> PAO1	34% [81] 9947002
19A7	-	-	wt	<i>flhA</i>	Flagellar protein	biosynthesis <i>P. aeruginosa</i> PAO1	85% [134] 9947403
20C11	wt	↓	wt		AMP-dependent synthetase and ligase	<i>A. vinelandii</i> AvOP	64% [73] 67157664
24A8	wt	↓	wt		Similar Uncharacterized protein conserved in bacteria	to <i>A. vinelandii</i> AvOP	60% [107] 67158191
					Secreted protein containing DUF541	γ proteobacterium KT 71	51% [81] 88704791
3F7	wt	-	wt	<i>sbcC</i>	Exonuclease	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1	80% [80] 77383442
5G11	wt	-	wt		Zn-dependent with chaperone function	protease <i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	90% [54] 46163862
13B4	wt	-	wt		Capsular polysaccharide biosynthesis protein	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	75% [148] 68345858
19H9	wt	-	wt		Conserved hypothetical protein	<i>A. vinelandii</i> AvOP	75% [85] 67155841
20E1	wt	-	wt		FAD-dependent oxidoreductase	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	67% [59] 104781296
20F10	wt	-	wt	PA4523	Hypothetical protein	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	63% [36] 9950765

*: phần trăm amino acid tương đồng. Các số liệu trong dấu ngoặc là số lượng amino acid tương đồng với cơ sở dữ liệu.

↑: tăng khả năng bơi hoặc di chuyển bề mặt ; ↓: giảm khả năng bơi, di chuyển bề mặt hoặc phân hủy phenanthrene

-: mất khả năng bơi hoặc di chuyển bề mặt ; wt: kiểu hình hoang dại

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., De Wachter, R., Verachtert, H. and Diels, L. (2000) Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *App. Environ. Microbiol.* 66, 1834-43.
- Bijdekerke, K. (2004) Pollutant driven motility of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria in soil. Thesis. Laboratory for Soil and Water Management and Centre of Microbial and Plant Genetics, Faculty of Applied Bioscience and Engineering, K.U.Leuven.

- Cerniglia, C.E. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351-68.
- Dennis, J.J. and Zylstra, G.J. (1998) Plasposons: Modular Self-Cloning Minitransposon Derivatives for Rapid Genetic Analysis of Gram-Negative Bacterial Genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2710-15.
- Dennis, J.J., and Sokol, P.A. (1995) Electrotransformation of *Pseudomonas*, p. 125-33. In J. A. Nickoloff (ed.), *Methods in molecular biology*, vol. 47. Electroporation protocols for microorganisms. Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- Ge, Y., Old, I.G., Girons, I.S. and Charon, N.W. (1997) The *flgK* motility operon of *Borrelia burgdorferi* is initiated by a sigma 70- like promoter. *Microbiol.* 143, 1681-90.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C.L. and Senesi, S. (2002) Requirement of *flhA* for swarming differentiation, Flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 184, 6424-33.
- Grimm, A.C and Harwood, C.S. (1997) Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *App. Environ. Microbiol.* 63, 4111-15.
- Gygi, D., Bailey, M.J., Allison, C. and Hughes, C. (1995) Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* 15, 761-69.
- Habe, H. and Omori, T. (2003) Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 225-43.
- Harshey, R.M and Matsuyama, T. (1994) Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 91, 8631-35.
- Kanally, R.A. and Harayama, S. (2000) Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059-67.
- Kinscherf, T.G. and Willis, D.K. (2002) Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 184, 2281-86.
- Leveau, J.H.J, Gerards, S., Fritsche, K., Zondag, G. and van Veen, J.A. (2006) Genomic flank-sequencing of plasposon insertion sites for rapid identification of functional genes. *J. Microbiol. Methods* xx, xxx-xxx.
- Masduki, A., Nakamura, J., Ohga, T., Umezaki, R., Kato, J. and Ohtake, H. (1995) Isolation and characterization of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 177, 948-52.
- Pandey, G. and Jain, R.K. (2002) Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: Role in bioremediation. *App. Environ. Microbiol.* 68, 5789-95.
- Samanta, S.K., Singh, O.V. and Jain, R.K. (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243-48.
- Sniegowski, K. (2005) Motility of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-degrading bacteria in soil: role of chemotaxis. Thesis. Laboratory for Soil and Water Management and Centre of Microbial and Plant Genetics, Faculty of Applied Bioscience and Engineering, K.U.Leuven.
- Uytendaele, M. (2005) Microbial ecology of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in PAH-contaminated soil. Dissertation. Laboratory for Soil and Water Management and Centre of Microbial and Plant Genetics, Faculty of Applied Bioscience and Engineering, K.U.Leuven.
- Yang, Z., Geng, Y. and Shi, W. (1998) A DnaK homolog in *Myxococcus xanthus* is involved in social motility and fruiting body formation. *J. Bacteriol.* 180, 218-224.