

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG VI KHUẨN OXY HÓA Fe(II), KHỬ NO₃⁻ TẠI MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG SINH THÁI Ở VIỆT NAM

Nguyễn Thị Tuyền¹, Đinh Thúy Hằng²

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Hà Nội

²Viện Vi sinh vật và công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

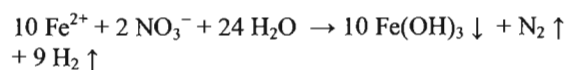
TÓM TẮT

Vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ trong các mẫu bùn thu thập ở thủy vực nước ngọt, chân ruộng ngập nước và vùng nước lợ ven biển được nghiên cứu về số lượng và tính đa dạng về thành phần loài. Kết quả thí nghiệm MPN (Most Probable Number) cho thấy trong ba dạng môi trường nghiên cứu, mẫu bùn ở chân ruộng ngập nước có số lượng tế bào vi khuẩn này cao hơn cả ($9,3 \cdot 10^3$ TB/g), gấp 5 lần mẫu bùn thủy vực nước ngọt và 2 lần so với mẫu bùn ven biển. Dựa trên những khác biệt về hình thái khuẩn lạc, 12 chủng đơn được phân lập từ các mẫu MPN khác nhau. Theo kết quả phân tích ARDRA sử dụng hai enzyme hạn chế *Hae*III và *Msp*I, các chủng này được xếp vào 5 nhóm di truyền khác nhau, chứng tỏ tính đa dạng khá cao của vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ tại các môi trường nghiên cứu. Phân tích thành phần loài trong quần thể ở độ pha loãng tới hạn của dãy MPN bằng phương pháp PCR-DGGE đối với 16S rDNA cho thấy *Anaeromyxobacter* sp. có mặt ở cả ba dạng môi trường sinh thái trên. Kết hợp với nghiên cứu các chủng đơn phân lập được từ các dạng môi trường nghiên cứu trên cho thấy, nhóm *Paracoccus* và *Pseudomonas* là hai nhóm vi khuẩn chính thực hiện quá trình oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻, tương ứng đóng vai trò quan trọng trong môi trường ao nước ngọt và chân ruộng ngập nước. Giải trình tự 16S rDNA và so sánh kết quả với ngân hàng dữ liệu đối với ba chủng đại diện là IN2, IN7 và IN12 cho phép xếp các chủng này tương ứng vào các chi vi khuẩn *Anaeromyxobacter*, *Pseudomonas* và *Paracoccus*. Ba chi vi khuẩn kể trên là các nhóm chính chiếm ưu thế trong chu trình chuyển hóa sắt tại ba dạng môi trường sinh thái được nghiên cứu ở đây.

Từ khóa: *Anaeromyxobacter*, ARDRA, DGGE, khử NO₃⁻, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, vi khuẩn oxy hóa Fe(II), 16S rDNA

MỞ ĐẦU

Sắt là một trong những kim loại phổ biến nhất trên trái đất. Thông thường sắt tồn tại ở dạng oxide Fe(III) ít tan trong nước và có màu vàng nâu. Trong môi trường pH trung tính, dạng hòa tan trong nước (Fe(II)) chỉ tồn tại ở điều kiện không có oxy, ví dụ như ở đáy các thủy vực, nơi oxy hòa tan trong nước đã bị các vi sinh vật hiếu khí sử dụng để phân hủy các hợp chất hữu cơ. Với hiệu điện thế oxy hóa khử Fe³⁺/Fe²⁺ tại pH 7 vào khoảng +200 mV, ion Fe(II) có thể trở thành nguồn điện tử cho các quá trình hô hấp kỵ khí, điển hình là khử NO₃⁻ thành N₂ do một số nhóm vi khuẩn đảm nhiệm (Benz *et al.*, 1998). Quá trình oxy hóa Fe(II) bằng NO₃⁻ diễn ra như sau:



Trong tự nhiên, quá trình oxy hóa Fe(II) với chất nhận điện tử là NO₃⁻ chủ yếu diễn ra ở ranh giới hiếu khí (có oxy) và kỵ khí (không có oxy) trong lớp trầm tích ở đáy các thủy vực. Oxy hóa Fe(II) kết hợp với

khử NO₃⁻ có thể đóng vai trò quan trọng trong môi trường ô nhiễm với nồng độ Fe(II) cao (do thiếu oxy) và NO₃⁻ cao (do chất hữu cơ bị phân hủy tạo thành) (Weber *et al.*, 2006). Các loài vi khuẩn với khả năng tiến hành phản ứng oxy hóa khử này có thể cùng một lúc thực hiện được hai nhiệm vụ, thứ nhất là chuyển Fe(II) hòa tan trong nước về dạng Fe(III) kết tủa, và hai là loại bỏ NO₃⁻, chuyển thành dạng N₂.

Vi khuẩn dùng ion Fe(II) làm nguồn cho điện tử để khử NO₃⁻ được phân lập đầu tiên từ các lớp trầm tích ao, hồ nước ngọt tại Bremen, Đức năm 1996 (Straub *et al.*, 1996). Một số công trình nghiên cứu tiếp sau cho thấy sự có mặt khá phổ biến của nhóm vi khuẩn này với mật độ khá cao (10⁶ tế bào/g trầm tích) trong các điều kiện môi trường khác nhau, bao gồm cả nước ngọt, nước lợ và nước mặn và tại nhiều vị trí địa lý khác nhau trên thế giới (Straub, Buchholz, 1998). Các loài vi khuẩn phổ biến nhất trong nhóm này được biết đến hiện nay là các loài thuộc chi *Chromobacterium* và *Klebsiella* (Benz *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2006). Các nghiên cứu trên thế giới mới chỉ đưa ra kết quả khảo sát về nhóm vi

khuẩn này ở châu Âu với điều kiện sinh thái hoàn toàn khác biệt với nước ta. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tìm hiểu tính đa dạng của vi khuẩn khử NO_3^- sử dụng Fe(II) là nguồn điện tử tại một số môi trường sinh thái đại diện ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp thu mẫu

Mẫu được thu thập ở ba môi trường sinh thái đại diện khác nhau: mẫu bùn đáy ao nước ngọt và chân ruộng ngập nước được thu ở ngoại thành Hà Nội, mẫu trầm tích nước lợ được thu ở ven biển Vân Đồn - Quảng Ninh. Mẫu được thu thập trong các ống thủy tinh nút xoáy với toàn bộ thể tích bình để giảm thiểu sự ảnh hưởng của oxy không khí tới quần thể vi sinh vật trong mẫu. Mẫu được bảo quản tại nhiệt độ 4°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

Xác định số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- bằng phương pháp MPN

Số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- được xác định theo phương pháp MPN (Most Propable Number), American Public Health Association, 1969) với thể tích 10% bùn đáy hoặc trầm tích trong môi trường khoáng dịch thể chứa NaNO_3 (5 mM), FeSO_4 (10 mM) làm chất nhận và chất cho điện tử. Môi trường dịch thể kỵ khí hoàn toàn có thành phần khoáng tương ứng với nước ngọt (dùng cho mẫu từ ao tù và chân ruộng ngập nước) hoặc nước lợ (dùng cho mẫu lấy từ Vân Đồn - Quảng Ninh) được chuẩn bị theo phương pháp do Widdel và Bak (1992) mô tả. Dây pha loãng được thực hiện đến độ pha loãng 10^{-8} , mẫu được ủ trong tủ ấm tại 28°C trong 8 tuần.

Phân lập vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- bằng phương pháp ống thạch bán lỏng

Ống MPN ở nồng độ pha loãng cao nhất có vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- phát triển được sử dụng làm nguồn phân lập các khuẩn lạc đơn. Việc phân lập được tiến hành theo phương pháp pha loãng trên dây ống thạch bán lỏng (1%) (Widdel, Bak, 1992) với môi trường có thành phần tương tự như môi trường dùng trong phương pháp MPN. Ống thạch bán lỏng sau khi bổ sung nguồn vi sinh vật (10%) từ ống MPN (nguồn phân lập) được sục khí N_2 và ủ ở tư thế đảo ngược đầu tại 28°C trong bóng tối. Khuẩn lạc đơn phát triển trong các ống pha loãng

được tách bằng pipet Pasteur và chuyển sang môi trường dịch thể thích hợp (nước ngọt hay nước lợ).

Xác định hàm lượng Fe(II) và NO_3^- trong môi trường nuôi cấy

Mẫu vi sinh vật oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- được nuôi cấy trong môi trường kỵ khí dạng dịch thể chứa Fe(II) (10 mM) và NO_3^- (5 mM) trong bình serum đậy kín bằng nút cao su. Mẫu dịch nuôi cấy (1 ml) được thu sau mỗi 24 h để xác định nồng độ Fe(II) và NO_3^- . Nồng độ Fe(II) được xác định bằng phương pháp so màu ở bước sóng 510 nm, sử dụng thuốc thử phenanthrolin (DIN 38406-E-1-1, 1983). Nồng độ NO_3^- được xác định bằng phương pháp so màu ở bước sóng 410 nm, sử dụng thuốc thử disulfocemic acid (Lê Đức, 2004).

Tách DNA tổng số

DNA tổng số của quần thể vi sinh vật từ các ống MPN được tách chiết theo phương pháp do Zhou và đồng tác giả (1996) mô tả với cải biến về nồng độ đệm phosphate và nồng độ proteinase K. DNA genome của các chủng đơn được tách theo phương pháp của Marmur (1961). DNA sau khi tách chiết được hòa tan trong nước và bảo quản tại -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Phân tích đa dạng của các chủng đơn bằng phương pháp ARDRA

ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses) là phương pháp thường được sử dụng để nghiên cứu mức độ đa dạng về di truyền của vi sinh vật dựa trên phân tích kết quả xử lý 16S rDNA bằng enzyme hạn chế. 16S rDNA của các chủng đơn sau khi được khuếch đại trong phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) và 1492R (GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) được xử lý bằng hai enzyme hạn chế *MspI* và *HaeIII* (Fermentas). Sản phẩm DNA sau khi đã xử lý enzyme được phân tách bằng điện di trên gel agarose 2% tại 100 V trong thời gian 30 phút. Các chủng vi khuẩn sẽ được xếp nhóm dựa trên sự tương đồng về phổ các băng điện di.

Phân tích cấu trúc quần thể bằng phương pháp điện di biến tính (DGGE)

Đoạn 16S rDNA với độ dài 550 bp được khuếch đại trong phản ứng PCR sử dụng cặp mồi GM5F (CCT ACG GGA GGC AGC AG) và 907R (CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT) (Muyzer *et al.*,

1993). Để tạo tính ổn định cho việc phân tách các trình tự DNA trên gel điện di biến tính, kẹp GC gồm 40 bp được gắn vào đầu 5' của mỗi GM5F. Điện di được tiến hành trên gel polyacrylamide 6% với dải biến tính urea/formamid từ 30 đến 60%. Quá trình điện di được thực hiện bằng bộ điện di Dcode™ System (BioRad) ở nhiệt độ 60°C tại 200 V trong 3,5 h. Sau khi điện di, gel polyacrylamide được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide (5 mg/ml) trong 30 phút, sau đó rửa nước và chụp ảnh dưới tia UV trên máy GelDoc (BioRad). Băng điện di được cắt và thoi DNA trong nước qua đêm tại 4°C, sau đó dùng làm khuôn để thực hiện PCR với cặp mỗi GM5F, 907R. Sản phẩm PCR tiếp theo được tinh sạch và giải trình tự.

Giải trình tự 16S rDNA

Đoạn 16S rDNA của các chủng đơn hoặc sản phẩm PCR từ các băng điện di biến tính được tiến hành phản ứng đọc trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trình tự trên máy tự động 3100 Avant Applied Biosystems. Trình tự gen sau đó được phân tích so sánh với trình tự 16S rDNA của các loài có liên quan hiện đã công bố trên Database DDBJ/EMBL/GenBank sử dụng phần mềm BLAST Search. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Saitou, Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ tại các môi trường nghiên cứu

Số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ trong các mẫu bùn đáy thu thập tại 3 môi trường sinh thái khác nhau được xác định thông qua phương pháp MPN sử dụng môi trường dịch thể chứa FeSO₄ làm chất cho điện tử và NaNO₃ làm chất nhận điện tử cuối cùng. Thành phần khoáng trong môi trường tương ứng với điều kiện nước ngọt (đối với mẫu bùn đáy ao và chân ruộng ngập nước) hoặc nước lợ (đối với mẫu bùn ven biển). Sự phát triển của vi sinh vật sinh trưởng nhờ oxy hóa Fe(II) trong các ống MPN được nhận biết thông qua biến đổi màu sắc của môi trường từ trắng xanh (màu của Fe(II)) sang màu vàng nâu (màu của Fe(III)) (Hình 1a).

Kết quả của thí nghiệm MPN (Hình 1b) cho thấy số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ cao nhất trong mẫu bùn chân ruộng ngập nước ($9,3 \times 10^3$ tế

bào/g bùn), cao hơn hẳn so với mẫu trầm tích nước lợ ven biển ($4,3 \times 10^3$ tế bào/g trầm tích) và mẫu bùn đáy ao nước ngọt ($1,5 \times 10^3$ tế bào/g bùn). Mật độ và mối tương quan giữa số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ với các điều kiện môi trường tại mỗi vùng sinh thái như trên cũng đã được tìm thấy trong một số nghiên cứu trước đây. Ratering (1999) khi nghiên cứu chu trình chuyển hóa sắt trong đất trồng lúa tại Italy đã phát hiện nồng độ các ion sắt trong môi trường này rất cao và các loài tham gia chu trình chuyển hóa sắt đóng vai trò quan trọng trong chu trình chuyển hóa vật chất tại đây. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ tại nhiều vùng khác nhau trên thế giới dao động trong khoảng từ $1 \cdot 10^3$ đến $5 \cdot 10^8$ tế bào/g mẫu khô (Weber *et al.*, 2006; Ratering, Schnell, 2000; Hauck *et al.*, 2001; Straub *et al.*, 1996).

Phân tích cấu trúc quần thể bằng điện di biến tính DGGE

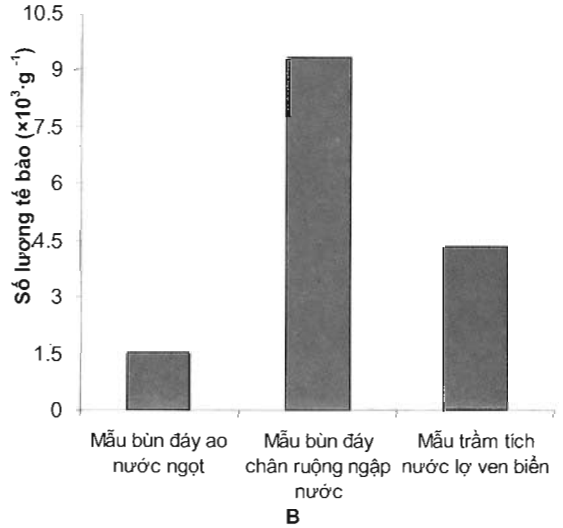
Để xác định các nhóm vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ chiếm ưu thế tại các môi trường nghiên cứu, chúng tôi tiến hành phân tích cấu trúc quần thể trong các ống MPN ở độ pha loãng 10^{-3} (là nồng độ gần tới hạn của dãy MPN đối với cả 3 mẫu) bằng phương pháp PCR-DGGE đoạn 16S rDNA (Hình 2). Các băng điện di được cắt từ gel và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR tiếp sau để xác định trình tự và so sánh với các trình tự 16S rDNA đã công bố trong ngân hàng dữ liệu GenBank.

Có thể thấy rằng, các loài *Anaeromyxobacter* có mặt trong cả 3 dạng môi trường nghiên cứu. Đây là nhóm vi khuẩn nằm trong phân lớp δ -*Proteobacteria*, hiện mới chỉ có một loài duy nhất được công bố là *A. dehalogenans* cùng với một số đại diện chưa định danh đến loài. Các chủng *Anaeromyxobacter* đã công bố đều sinh trưởng kỵ khí khử Fe(III), chưa có chủng nào được nghiên cứu về khả năng sinh trưởng khử NO₃⁻, sử dụng Fe(II) làm chất cho điện tử (Treude *et al.*, 2003; Straub, Buchholz-Cleven, 1998; Straub *et al.*, 1996). Trong môi trường nuôi cấy sử dụng ở đây (cũng như trong điều kiện tự nhiên), Fe(III) đồng thời tồn tại với Fe(II) do kết quả chuyển hóa Fe(II) bằng con đường hóa học (phản ứng với lượng nhỏ oxy trong môi trường) và con đường sinh học (do các vi sinh vật oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻). Do vậy, sự có mặt của các loài sinh trưởng kỵ khí khử Fe(III) như *Anaeromyxobacter* trong điều kiện môi trường nghiên cứu trên (cũng như trong tự

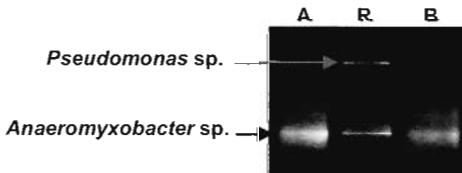
hiển) là mắt xích khép kín chu trình chuyển hóa sắt tại đây.

Nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* chiếm ưu thế trong mẫu bùn ở chân ruộng ngập nước. Đây là chi thuộc phân lớp γ -*proteobacteria*, có nhiều đại diện sinh trưởng kỵ khí khử NO_3^- , bao gồm cả các loài có khả năng sử dụng Fe(II) làm chất cho điện tử (Weber

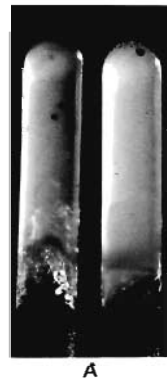
et al., 2006; Ratering, Schnell, 2000; Schlaweigh, 2000). Đối với các mẫu bùn ao và trầm tích ven biển, bằng phương pháp PCR-DGGE thực hiện ở đây chúng tôi chưa xác định được nhóm vi khuẩn oxy hóa Fe(II) khử NO_3^- chiếm ưu thế. Tuy nhiên, những thông tin về vấn đề này sẽ được bổ sung khi tiến hành nghiên cứu đa dạng các chủng đơn phân lập được từ các môi trường kể trên.



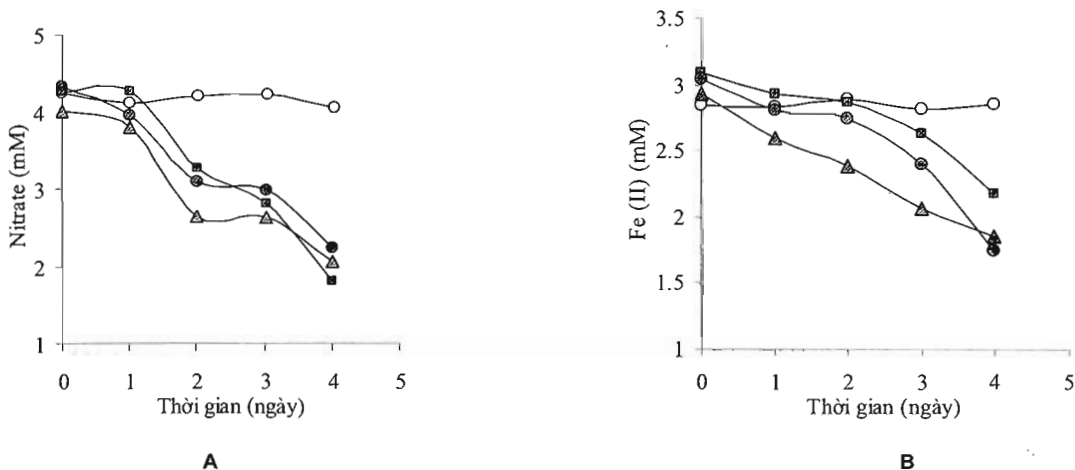
Hình 1. Xác định số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- trong các môi trường sinh thái khác nhau. **A.** Nhận biết sự có mặt của vi khuẩn trong các ống MPN thông qua biến đổi màu sắc của môi trường từ trắng xanh (Fe(II)) sang vàng nâu (Fe(III)). **B.** Số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- xác định thông qua phương pháp MPN.



Hình 2. Phổ điện di biến tính (DGGE) phân tích đoạn 16S rDNA của quần thể vi sinh vật trong các ống MPN của các mẫu nghiên cứu. A. Bùn ao nước ngọt; R. Bùn chân ruộng ngập nước; B. Bùn trầm tích ven biển.



Hình 4. Phân lập vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- đại diện tại các môi trường nghiên cứu. **A.** Phân lập chủng đơn thông qua phương pháp ống thạch kỵ khí bán lỏng; **B.** Nuôi cấy chủng đơn vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- trong môi trường dịch thể ở điều kiện kỵ khí hoàn toàn.



Hình 3. Hoạt tính oxy hóa Fe(II) (A) và khử NO_3^- (B) của các quần thể vi sinh vật tại ba môi trường nghiên cứu sau khi làm giàu bằng phương pháp MPN. Ký hiệu: O. Đối chứng không có VSV; ■. Mẫu bùn đáy ao nước ngọt; ●. Mẫu bùn chân ruộng ngập nước; ▲. Mẫu trầm tích nước lợ ven biển.

Mức độ oxy hóa Fe(II) và khử NO_3^- của vi sinh vật trong các mẫu nghiên cứu

Nồng độ Fe(II) và NO_3^- trong môi trường nuôi cấy được xác định theo thời gian để đánh giá khả năng sinh trưởng của vi sinh vật trong các mẫu làm giàu (Hình 3).

Như vậy, các quần thể vi sinh vật được làm giàu qua dãy MPN thể hiện khả năng sinh trưởng với Fe(II) và NO_3^- khá cao. Ở cả 3 mẫu, lượng nitrate trong môi trường bị khử gần hoàn toàn sau 4 ngày (Hình 3B), tuy nhiên lượng Fe(II) không giảm tương ứng (Hình 3A). Hiện tượng này có thể lý giải bằng sự có mặt của nhóm vi khuẩn *Anaeromyxobacter* trong cả 3 mẫu phân tích, làm chuyển hóa Fe(III) thành Fe(II).

Phân lập vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- từ các mẫu nghiên cứu và đánh giá tính đa dạng của các chủng phân lập

Vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- được phân lập theo phương pháp pha loãng trong dãy ống thạch bán lỏng (1%) (Widdel, Bak, 1992) (Hình 4a). Các khuẩn lạc đơn được phân lập dựa trên sự khác nhau về hình dạng, kích thước khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc được tách riêng và nuôi cấy kỵ khí trong môi trường dịch thể chứa Fe(II) (10 mM) và NO_3^- (5 mM) trong bình serum có nút cao su và kẹp nhôm (Hình 4b). 12 khuẩn lạc đơn được phân lập từ các ống MPN ở độ pha loãng cao nhất có vi sinh vật phát triển (Bảng 1)

là đại diện cho vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- chiếm đa số tại ba môi trường nghiên cứu.

Tính đa dạng của 12 chủng vi khuẩn đã phân lập ở trên được phân tích bằng phương pháp ARDRA sử dụng hai enzyme hạn chế *HaeIII* và *MspI* (Hình 5).

Kết quả thu được cho thấy, các chủng này có thể xếp vào 5 nhóm di truyền khác nhau (Bảng 2). Từ kết quả phân nhóm ở bảng 2 kết hợp với nguồn gốc phân lập 12 chủng này (Bảng 1), có thể nhận thấy tính đa dạng di truyền của 12 chủng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- phụ thuộc vào địa điểm thu mẫu ban đầu. Mẫu trầm tích nước lợ ven biển thể hiện mức độ đa dạng di truyền cao nhất với 4 chủng phân lập từ mẫu này (IN5, IN6, IN7, IN8) thuộc vào 4 nhóm khác nhau (nhóm 2, nhóm 3, nhóm 4 và nhóm 5). Tiếp đến là mẫu bùn đáy ao nước ngọt với 4 chủng (IN9, IN10, IN11, IN12) thuộc vào 3 nhóm khác nhau (nhóm 1, nhóm 2 và nhóm 4). Thể hiện tính đa dạng di truyền thấp nhất là mẫu bùn chân ruộng ngập nước với 4 chủng (IN1, IN2, IN3, IN4) thuộc vào 2 nhóm khác nhau (nhóm 1 và nhóm 2).

Ba chủng IN2, IN7 và IN12 đại diện cho 3 nguồn phân lập và đại diện cho các nhóm ARDRA chính (Bảng 2, tên chủng in đậm) được lựa chọn để tiến hành phân tích trình tự đầy đủ của 16S rDNA và định danh khoa học. Chủng IN2 đại diện cho nhóm ARDRA-1 gồm 4 chủng từ hai dạng môi trường nước ngọt, chiếm trên 30% trong tổng số các chủng phân lập được. Tương tự, chủng IN12 đại diện cho

nhóm ARDRA-4 gồm 3 chủng từ môi trường nước lợ và ao nước ngọt, chiếm 25% trong tổng số các chủng phân lập được. Chủng IN7 làm thành một nhóm riêng biệt (ARDRA-5), chỉ tìm thấy ở môi trường nước lợ ven biển. Kết quả so sánh trình tự 16S rDNA của các chủng này với ngân hàng dữ liệu GenBank cho thấy, chủng IN2 có độ tương đồng cao nhất với *Anaeromyxobacter dehalogenans* (99%), chủng IN7 với *Pseudomonas stutzeri* (98%) và chủng IN12 với *Paracoccus ferroxydant* (97%) (Hình 6).

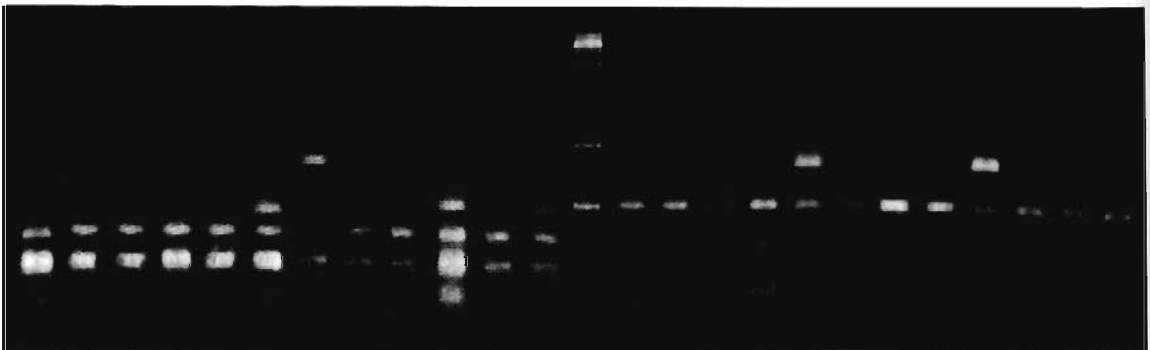
Như vậy, nhóm ARDRA-4 với chủng IN12 làm đại diện là các loài *Paracoccus* và được tìm thấy trong hai dạng môi trường nước lợ ven biển và ao nước ngọt. *Paracoccus* là chi vi khuẩn nằm trong

phân lớp α -proteobacteria, gồm các loài sinh trưởng kỵ khí tùy tiện, hô hấp bằng nitrate hoặc oxy (Schapleigh, 2000). Kết hợp với kết quả phân tích PCR-DGGE ở trên có thể thấy rằng, *Paracoccus* và *Pseudomonas* là hai nhóm chính oxy hóa Fe(II) khử NO_3^- chiếm ưu thế trong ba dạng môi trường được nghiên cứu, trong đó *Paracoccus* có vai trò quan trọng hơn ở ao nước ngọt và *Pseudomonas* ở ruộng ngập nước. Đại diện của cả hai nhóm này được tìm thấy ở môi trường nước lợ ven biển, có thể là do ảnh hưởng của nguồn nước ngọt từ đất liền.

Dựa trên kết quả so sánh trình tự 16S rDNA ở trên, các chủng IN2, IN7 và IN12 được định danh lần lượt là *Anaeromyxobacter* sp. IN2, *Pseudomonas* sp. IN7 và *Paracoccus* sp. IN12.

Bảng 1. Vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- phân lập được từ các môi trường nghiên cứu.

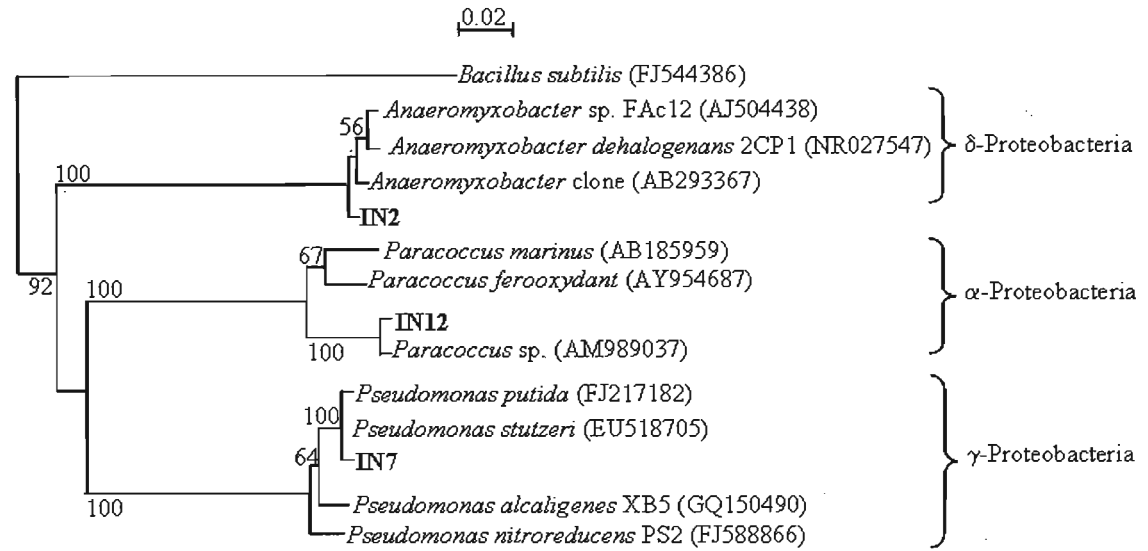
Nguồn phân lập	Chủng vi khuẩn	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc
Chân ruộng lúa ngập nước (ngoại thành Hà Nội)	IN1	Hình tròn, bề mặt nhẵn, kích thước 1 - 2 mm
	IN2	Hình tròn, bề mặt không nhẵn, kích thước 0,25 - 0,5 mm
	IN3	Hình tròn, bề mặt xù xì, kích thước 0,25 - 0,5 mm
	IN4	Hình tròn, bề mặt xù xì, kích thước 1 - 2 mm
Trầm tích nước lợ tại biển (Vân Đồn, Quảng Ninh)	IN5	Hình tròn, bề mặt nhẵn, kích thước 0,25 mm
	IN6	Hình bầu dục, bề mặt nhẵn, kích thước 0,25 - 0,5 mm
	IN7	Hình tròn, bề mặt xù xì, kích thước 0,8 mm
	IN8	Hình tròn tia, mật độ tế bào ở ngoài ít hơn phía trong, kích thước 1 - 1,5 mm
Đáy ao nước ngọt (ngoại thành Hà Nội)	IN9	Hình tròn, bề mặt xù xì, kích thước 0,5 - 1 mm
	IN10	Hình tròn không đều, kích thước 0,5 - 1 mm
	IN11	Hình tròn, bề mặt nhẵn, kích thước 0,2 - 0,3 mm
	IN12	Hình đĩa lõm hai mặt, kích thước 2 - 2,5 mm



Hình 5. Phổ điện di 16S rDNA của 12 chủng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO_3^- sau khi xử lý bằng các enzyme hạn chế *HaeIII* và *MspI*. IN1 – IN12: Ký hiệu của 12 chủng đơn phân lập được từ các mẫu nghiên cứu; M: Marker 1 kb (Enzymomics, Hàn Quốc).

Bảng 2. Tính đa dạng về di truyền của 12 chủng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ đã phân lập (IN1 – IN12) dựa trên phân tích ARDRA.

Nhóm ARDRA	Chủng vi khuẩn	Các đoạn DNA tạo ra sau khi xử lý 16S rDNA bằng các enzyme hạn chế (bp)	
		<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>
1	IN1, IN2 , IN4, IN11	200, 300	300, 500
2	IN3, IN8	200, 300	500
3	IN5, IN9	200, 300	500, 800
4	IN6, IN10, IN12	200, 300, 500	300, 500
5	IN7	200, 900	500



Hình 6. Cây phân loại thể hiện mối liên quan giữa các chủng IN2, IN7, IN12 và các loài gần gũi dựa trên trình tự 16S rDNA. Cây được dựng theo phương pháp neighbor-joining, đơn vị = 0,02 K_{nuc} trong trình tự nucleotide. Các số hiển thị ở các vị trí phân nhánh là kết quả phân tích bootstrap đối với 1000 phép so sánh (chỉ có các giá trị trên 50% được trình bày trên hình). *B. subtilis* là loài vi khuẩn được chọn làm outgroup.

KẾT LUẬN

Số lượng vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ trong các mẫu bùn thu thập ở thủy vực nước ngọt, chân ruộng ngập nước và vùng nước lợ ven biển được xác định nằm trong khoảng 10³ – 10⁴ TB/g, trong đó mẫu bùn ở chân ruộng ngập nước có số lượng tế bào vi khuẩn này cao hơn cả (9,3 · 10³ TB/g). Vi khuẩn oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻ tại các môi trường nghiên cứu có tính đa dạng khá cao. Mười hai chủng đơn phân lập từ các mẫu MPN được xếp vào 5 nhóm ARDRA khác nhau trong phân tích sử dụng hai enzyme giới hạn *HaeIII* và *MspI*. Phân tích thành phần loài bằng phương pháp PCR-DGGE

đối với 16S rDNA cho thấy *Anaeromyxobacter* là một trong những nhóm chiếm ưu thế có mặt cả ở ba dạng môi trường sinh thái trên, đóng vai trò khép kín chu trình chuyển hóa sắt trong các môi trường nghiên cứu thông qua khả năng sinh trưởng kỵ khí khử Fe(III). Kết hợp với kết quả nghiên cứu các chủng đơn phân lập được từ các dạng môi trường nghiên cứu trên cho thấy *Paracoccus* và *Pseudomonas* là hai nhóm vi khuẩn chính thực hiện quá trình oxy hóa Fe(II), khử NO₃⁻, tương ứng đóng vai trò quan trọng trong môi trường ao nước ngọt và chân ruộng ngập nước. Ba chủng đại diện là IN2, IN7 và IN12 có trình tự 16S rDNA có độ tương đồng cao với các loài vi khuẩn *Anaeromyxobacter*

dehalogenans (99%), *Pseudomonas stutzeri* (97%) và *Paracoccus ferrooxydant* (98%), do vậy được đặt tên lần lượt là *Anaeromyxobacter* sp. IN2, *Pseudomonas* sp. IN7 và *Paracoccus* sp. IN12. Hai chủng IN2 và IN7 là các chủng vi khuẩn có tiềm năng ứng dụng trong việc xử lý các nguồn nước ngầm nhiễm sắt và nitrate.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài QG.07.26. Tác giả xin trân trọng cảm ơn Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội đã tạo điều kiện trong quá trình thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

American public health association (1969) Standard methods for the examination of water and waste water including bottom sediments and sludge. 604-609.

Benz M, Brune A, Schink B (1998) Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 169: 159-165.

DIN 38406-E1-1 (1983) German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; cation (group E); determination of iron (E1).

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Hauck S, Benz M, Brune A, Schink B (2001) Ferrous iron oxidation by denitrifying bacteria in profundal sediments of a deep lake (Lake Constance). *FEMS Microbiol Ecol* 37: 127-134.

Lê Đức (2004) *Một số phương pháp phân tích môi trường*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208-218.

Muyzer G, De Waal EC, Utterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial population by denaturing gradient

gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rARN. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.

Ratering S (1999) Iron cycle in italian rice field soil: localization of the redox processes and characterization of the involved microorganisms. *PhD Dissertation*. Department of Microbiology, University of Marburg (Germany).

Ratering S, Schnell S (2000) Nitrate-dependent iron(II) oxidation in paddy soil. *Environ Microbiol* 3: 100-109.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Shapleigh JP (2000) *The Denitrifying Prokaryotes*. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackbrandt E, eds. *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. Springer-Verlag, New York.

Straub KL, Benz M, Schink B, Widdel F (1996) Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl Environ Microbiol* 62: 1458-1460.

Straub KL, Buchholz-Cleven BEE (1998) Enumeration and detection of anaerobic ferrous iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria from diverse European sediments. *Appl Environ Microbiol* 64: 4846-4856.

Treude N, Rosencrantz D, Liesack W, Schnell S (2003) Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales*. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 261-269.

Weber KA, Urrutia MM, Churchill PF, Kukkadapu RK, Roden EE (2006) Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environ Microbiol* 8: 100-113.

Widdel F, Bak F (1992) *Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria*. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH eds. *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York: 3352-3378.

Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316-322.

STUDY ON DIVERSITY OF ANAEROBIC Fe(II)-OXIDIZING, NO₃⁻-REDUCING BACTERIA IN SOME ECOLOGICAL ENVIRONMENTS IN VIETNAM

Nguyen Thi Tuyen¹, Dinh Thuy Hang^{2,*}

¹Hanoi University of Science, VNU

²Institute of Microbiology and Biotechnology, VNU

SUMMARY

Fe(II)-oxidizing, NO₃⁻-reducing bacteria in sediment samples collected from freshwater aquifer, flooded paddy soil and estuarine area were quantified and analysed on species composition. The MPN results showed that among the three studied environments, flooded paddy soil had the highest number of these bacteria ($9.3 \cdot 10^3 \cdot \text{g}^{-1}$), five and two times higher than that of freshwater aquifer and estuarine sediment, respectively. Based on distinguish colony characteristics, 12 strains of Fe(II)-oxidizing, NO₃⁻-reducing bacteria were isolated from MPN series and were set into five genetically different groups as proposed by ARDRA analyses with two restriction enzymes *Hae*III and *Msp*I, showing relatively high diversity of this bacterial group in the studied environments. Analysing species composition in the communities developed in MPN tubes at the highest dilution via PCR-DGGE of 16S rDNA revealed that *Anaeromyxobacter* species presented in all three above environments. In combination with the culture-dependent studies, it was revealed that *Paracoccus* and *Pseudomonas* were dominant groups playing important roles in freshwater aquifer and flooded paddy soil, respectively. Sequencing of 16S rDNA from three representative strains IN2, IN7 and IN12 suggested that they are respectively belonged to *Anaeromyxobacter*, *Pseudomonas* and *Paracoccus* genera.

Keywords: Fe(II)-oxidizing, NO₃⁻-reducing bacteria, DGGE, ARDRA, *Anaeromyxobacter*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, 16S rDNA

*Author for correspondence: Tel: 84-4-37547694; E-mail: dthang@vnu.edu.vn