

PHÂN TÍCH CỘNG ĐỒNG VI KHUẨN TRONG RƠM RẠ TRƯỚC VÀ SAU Ủ BẰNG KỸ THUẬT PCR-DGGE VÀ TẠO DÒNG

Ngô Đức Duy[✉], Nguyễn Hoàng Dũng, Hoàng Quốc Khánh

Viện Sinh học nhiệt đới (ITB), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

[✉]Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ngoduy007itb@gmail.com

Ngày nhận bài: 22.4.2019

Ngày nhận đăng: 09.7.2019

TÓM TẮT

Sử dụng kỹ thuật PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) phân tích cộng đồng vi khuẩn dựa trên đoạn gen V3 từ mẫu Rơm trước ủ (R) và mẫu Rơm sau ủ (Rn). Bên cạnh đó kết hợp với phương pháp tạo dòng (Cloning) phân tích mẫu Rn và so sánh kết quả phân tích cộng đồng vi khuẩn với phương pháp PCR-DGGE cho kết quả tương tự đó là mục tiêu chính trong nghiên cứu này. Kết quả thu nhận từ kỹ thuật PCR-DGGE của mẫu R có 5 đoạn gen V3 (R1, R2, R3, R4 và R5) và còn mẫu Rn có 4 đoạn gen V3 (Rn1, Rn2, Rn3 và Rn4). So sánh nhóm vi khuẩn ở mẫu R và Rn cho thấy sự đa dạng vi khuẩn trong mẫu R gồm các dòng *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroidetes*, *Thermopolysporasa* và *Bacillus*. Nhưng trong mẫu sau ủ thì kết quả vi khuẩn còn lại 2 dòng chính là *Agrobacterium* và *Clostridium*. Tiếp tục sử dụng phương pháp tạo dòng từ mẫu Rn cũng cho 4 vị trí và kích thước phân đoạn gen tương ứng vị trí của Rn1, Rn2, Rn3 và Rn4 từ đại diện khoảng 30 mẫu gen thu nhận từ sản phẩm tạo dòng. Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự các đoạn gen V3 từ hai phương pháp với các cơ sở dữ liệu có trên ngân hàng gen NCBI, kết quả gen Rn1 và Rn4 tương đồng với chi *Agrobacterium* khoảng 96%, gen Rn2 và Rn3 cũng tương đồng với chi *Clostridium* khoảng 99%. Tóm lại kết quả phân tích cộng đồng vi khuẩn trong mẫu R cho thấy sự đa dạng vi khuẩn nhưng ít ổn định hơn so với mẫu Rn. Ngoài ra kỹ thuật tạo dòng và PCR-DGGE cho kết quả tương tự nhau trên mẫu Rn.

Từ khóa: Cộng đồng vi khuẩn, gel acrylamide, PCR-DGGE, rơm rạ, tạo dòng

MỞ ĐẦU

Hiện nay, có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử đã được phát triển để xác định vi sinh vật ở cấp độ loài như RFLP, RAPD, Multiplex PCR, DGGE, Cloning và gần đây nhất là Metagenomic. Trong đó, DGGE là kỹ thuật sinh học phân tử cơ bản, được công bố lần đầu tiên bởi Fischer và Lerman (1983), phương pháp này dựa trên sự thay đổi về nucleotide trong cấu trúc mạch DNA và kỹ thuật DGGE điện di trong nồng độ gel acrylamide biến tính sẽ cho phép phân tách các sản phẩm đoạn gen có cùng kích thước nhưng có sự thay đổi nucleotide trong mạch gen đó. Phương pháp này cũng đã

được ứng dụng khá phổ biến trong việc xác định đa dạng cộng đồng vi sinh vật trong môi trường với các điều kiện sinh thái khác nhau như xác định cộng đồng xạ khuẩn trong đất Antarctic từ vùng Barrientos của Island (Learn *et al.*, 2012), khảo sát tính đa dạng hệ vi sinh vật trong biểu mô dạ cỏ của bò (Salet *et al.*, 2007), hệ vi sinh vật cổ sinh khí methan từ đất ruộng của Watanabe và đồng tác giả (2004). Ngoài sử dụng kỹ thuật DGGE trong nghiên cứu về đa dạng vi sinh vật thì phương pháp này cũng sử dụng phân tích cộng đồng tuyến trùng theo công bố của Okada (2010). Bên cạnh đó, kỹ thuật DGGE có thể được kết hợp với các kỹ thuật khác như TGGE hoặc SSCP nhằm làm tăng độ

tin cậy của phương pháp khi đánh giá đa dạng vi sinh vật của Muyzer và đồng tác giả (1999) kết hợp kỹ thuật DGGE/TGGE khi xác định các gen vi sinh vật từ hệ sinh thái tự nhiên. Trong khi Hori và đồng tác giả (2006) so sánh trực tiếp phương pháp SSCP và DGGE liên quan tới đặc điểm cộng đồng vi sinh dựa trên đoạn gen 16S rRNA. Bên cạnh kỹ thuật DGGE, kỹ thuật tạo dòng cũng được ứng dụng trong phân tích hệ vi sinh vật trong bể phân hủy của chất thải chăn nuôi ở công nghiệp trong công bố của Cheon và đồng tác giả (2008). Phương pháp tạo dòng chủ yếu được sử dụng trong việc tạo thư viện gen, kiểm tra biểu hiện gen mục tiêu, sản xuất sản phẩm thứ cấp khác thông qua chuyển gen.

Các công trình công bố trong nước về kỹ thuật DGGE trong những năm gần đây đã được ứng dụng trong nghiên cứu đa dạng vi sinh ở các mẫu vật và hệ sinh cảnh khác nhau như xác định đa dạng vi khuẩn trong bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng bằng kỹ thuật PCR-DGGE (Nguyễn Bá Hữu *et al.*, 2008) và trong các công thức thử nghiệm xử lý đất ô nhiễm chất độc hóa học của nhóm tác giả Nguyễn Thanh Thủy và đồng tác giả (2004). Bên cạnh đó có công bố về phân tích cộng đồng vi khuẩn trong phân bò ủ bằng phương pháp và phân tích cộng đồng vi khuẩn trong Rơm rạ cũng bằng kỹ thuật PCR-DGGE của nhóm tác giả Ngô Đức Duy và đồng tác giả (2012, 2013).

Hiện nay chưa có công bố nào trong nước kết hợp hoặc so sánh kỹ thuật tạo dòng và PCR-DGGE để phân tích cộng đồng vi khuẩn. Điều này chứng minh sự đa dạng của việc ứng dụng phương pháp DGGE trong nghiên cứu cộng đồng vi sinh vật trong cùng một mẫu, nhưng sự áp dụng chung và cả riêng cho cả phương pháp PCR-DGGE và tạo dòng để phân tích ít được áp dụng. Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng cả hai kỹ thuật PCR- DGGE và tạo dòng trong cùng một phân tích cộng đồng vi khuẩn có khả năng phân hủy Rơm rạ nhằm xác định sự thay đổi những dòng vi khuẩn hiện diện trong mẫu rơm trước và sau ủ. Bên cạnh đó cũng định hướng sử dụng công cụ sinh học phân tử đánh

giá và phân tích đa dạng cộng đồng vi sinh vật trong điều kiện môi trường sống ảnh hưởng sự biến đổi khí hậu ngày càng phức tạp làm tiền đề cho các nghiên cứu khác.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Sử dụng mẫu R và Rn thu nhận từ phương pháp ủ truyền thống trước khi trồng nấm Rơm được thu nhận tại Xã Tân Hòa, Huyện Lai Vung, Tỉnh Đồng Tháp.

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu như; Lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 100 mM sodium phosphate pH 8, 1,5 M NaCl và 1% CTAB), proteinase K (10 mg/mL), SDS 10%, chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v), isopropanol, ethanol 77% và 99,5%...

Hóa chất dùng trong phản ứng PCR: H₂O, dNTPs, PCR buffer 10X, Mg²⁺, Taq polymerase, các cặp mồi được sử dụng trong PCR và DGGE là; 357F-GC:5' -CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' và 517R:5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG -3', 357F:5' -CCT ACG GGA GGC AGC AG -3' và 517R:5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG -3' theo Muyzer *et al.*, 1993.

Hóa chất dùng trong phương pháp DGGE: polyacrylamide, bis-polyacrylamide, SYBR Green, Gel Temed, PSA, urea, fomamide, TAE.

Vector và quy trình thực hiện được sử dụng trong kỹ thuật cloning là pGEM[®]-T Easy vector của hãng Promega có kích thước là 3015 bp, bao gồm 3 vùng gen chính là: Ampicillin, Ori và *Lac Z*, chủng vi khuẩn *E.coli* JM109 được sử dụng trong phương pháp tạo dòng.

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình tách chiết và thu nhận DNA

Quy trình này được thực hiện theo phương pháp CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) (Muyzer *et al.*, 1999) và tinh sạch sản

phẩm genomic DNA và sản phẩm gen V3 bằng QIAGEN kit. Quy trình Tạo dòng thực hiện theo protocol của hãng Promega và thu nhận sản phẩm plasmid bằng QIAGEN kit.

Chu kỳ phản ứng PCR cho gen 16S rDNA như sau: 95°C/10p, 93°C/1p, 50°C/1p, 72°C/2p, (95°C/30g, 50°C/30g, 72°C/2p) lặp lại 30 chu kỳ, 95°C/1p, 50°C/1p, 72°C/5p và chu kỳ phản ứng PCR vùng V₃ của DGGE: 95°C/10p, (93°C/30g, 65°C/40g, 72°C/1p) lặp lại 9 chu kỳ, (93°C/30g, 60°C/40g, 72°C/1p) lặp lại 9 chu kỳ, (93°C/30g, 55°C/40g, 72°C/1p) lặp lại 8 chu kỳ, 93°C/30g, 55°C/40g, 72°C/5p.

Thu nhận và tinh sạch genomic DNA

Quy trình tinh sạch sau khi cắt band DNA trên gel polyacrylamide, thêm 300µl ethanol 99,9%. Ly tâm 13.000 rpm/phút, loại bỏ ethanol, thêm 200µl DEB. Tiếp tục sử dụng bộ KIT QIAEX II để tiếp tục tinh sạch và thu nhận DNA từ gel acrylamide.

Các phần mềm và web trực tuyến cho phân tích dữ liệu trình tự đoạn gen

Phần mềm SeaView thiết lập và so sánh sự tương đồng giữa các trình tự gen, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> dùng cho việc BLAST dữ liệu công cụ phân tích so sánh trình tự gen trong ngân hàng và trình tự so sánh.

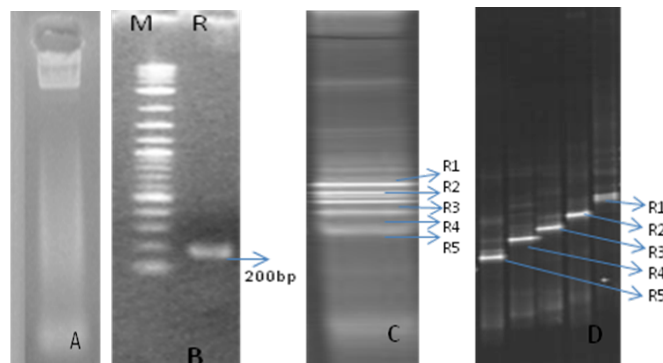
Quá trình tách chiết và thu nhận plasmid thực hiện theo protocol của hãng Nippon Genetics.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

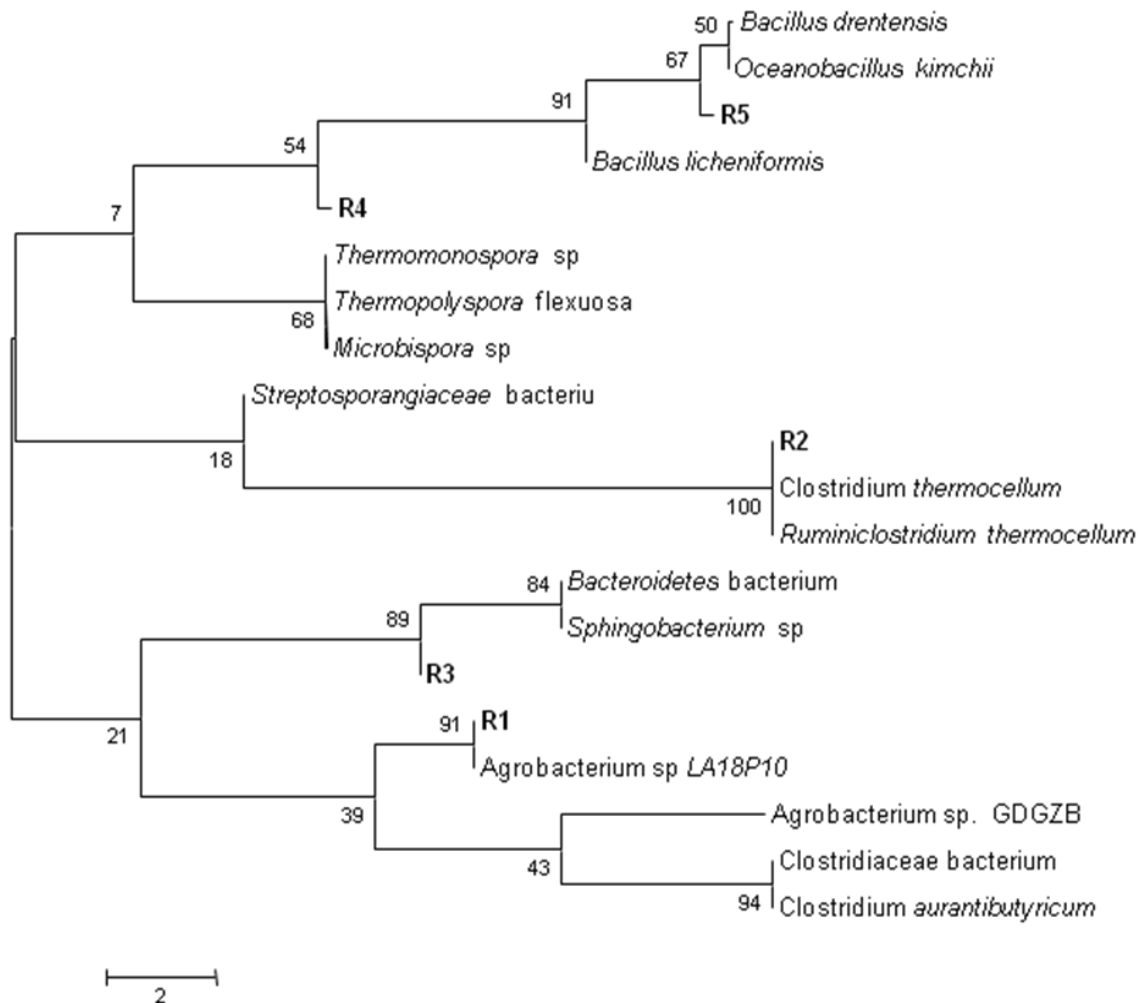
Thu nhận DNA và sản phẩm nhân bản đoạn gen V3 của mẫu R

Kết quả ly trích và thu nhận DNA của cộng đồng vi sinh vật trực tiếp từ mẫu R, cho thấy rằng sản phẩm DNA bộ gen đã được tách chiết bằng phương pháp CTAB xem Hình 1A. Tiếp tục sử dụng sản phẩm DNA nhân bản đoạn gen V3 thuộc vùng 16S rDNA dựa trên cặp mồi 357F-GC và 517R với kết quả thu được ở Hình 1B. Tuy nhiên kết quả này chưa cho chúng ta biết được gì về các đoạn gen chuyên biệt của từng loài vi khuẩn trong cùng một mẫu. Sử dụng kỹ thuật DGGE lần 1 (Hình 1C) và DGGE lần 2 (Hình 1D) từ sản phẩm V3 của mẫu R nhằm tách riêng rẽ các trình tự của mỗi đoạn gen dựa vào gradient biến tính có nồng độ từ 40% đến 60% trong gel polyacrylamide cho kết luận rằng trong mẫu R có tồn tại 5 đoạn gen V3 được ký hiệu là R1, R2, R3, R4 và R5 có thể thuộc các chủng vi khuẩn khác nhau.

Kết quả giải trình tự 5 đoạn gen trên và so sánh mức độ tương đồng vùng gen trong Ngân hàng dữ liệu NCBI với công cụ BLAST và cùng với xây dựng cây phân loại loài xem Hình 2. Cho thấy tính đa dạng nhóm vi khuẩn trong mẫu R và có mức độ tương đồng vùng gen V3 tương ứng như sau; gen R1 tương ứng với dòng vi khuẩn *Agrobacterium*, R2 thuộc dòng *Clostridium*, R3 tương ứng với dòng *Bacteroidetes*, R4 tương tự dòng *Thermopolysporasa* và R5 thuộc dòng *Bacillus*.



Hình 1. Kết quả ly trích và thu nhận DNA cộng đồng vi sinh từ mẫu Rom trước ủ (A), sản phẩm PCR đoạn gene V3 cộng đồng vi sinh trên gel agarose 1% chạy trong 100volt/40phút (B), sản phẩm phân đoạn gene được tách theo phương pháp DGGE lần 1 chạy trong nguồn điện 200volt/300phút trên gel polyarylamide 40-60%(C) và tương tự DGGE lần 2 (D).



Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên phân tích trình tự vùng gen V3 (R1,R2,R3, R4, và R5) được phân lập mẫu Rơm chưa ủ và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI.

Theo dữ liệu công bố từ các nghiên cứu của (Vila *et al.*, 2003) đã cho thấy cộng đồng vi khuẩn trong phân ủ Rơm rạ như *Alphaproteobacteria* trong mẫu Rơm rạ ban đầu chưa ủ, *Bacillus* và *Actinomyces* ở giai đoạn ưa nhiệt, *Cytophaga* và *Clostridial* trong giai đoạn ủ nhiều tuần. Một nghiên cứu khác của (Steger *et al.*, 2007) cho thấy thay đổi thành phần trong cộng đồng *Actinobacteria* trong quá trình ủ thải hữu cơ theo quy mô của hộ gia đình. So sánh với kết quả thu được cho thấy hệ vi khuẩn của mẫu R có sự hiện diện của vài dòng vi khuẩn giống như đã công bố. Bên cạnh đó thấy đa dạng nhóm vi khuẩn cũng tùy thuộc vào

từng loại Rơm rạ, quá trình canh tác và vận chuyển.

Ly trích thu nhận DNA và sản phẩm nhân bản đoạn gen V3 của mẫu Rn

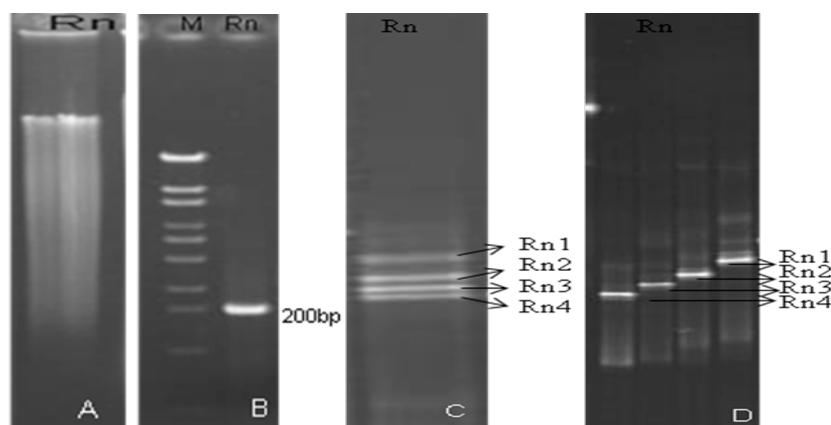
Kết quả ly trích và thu nhận DNA của cộng đồng vi sinh vật trực tiếp từ mẫu Rơm sau ủ (Rn) sử dụng làm nguyên liệu trồng Nấm Rơm, cho thấy rằng sản phẩm DNA bộ gen đã được tách chiết bằng phương pháp CTAB xem Hình 3A. Và các bước thực hiện ở Hình 3B, 3C và 3D tương tự qui trình thực hiện như ở Hình 1.

Kết quả tạo dòng trên vector pGEM[®]-T Easy của hãng Promega có kích thước là 3015 bp

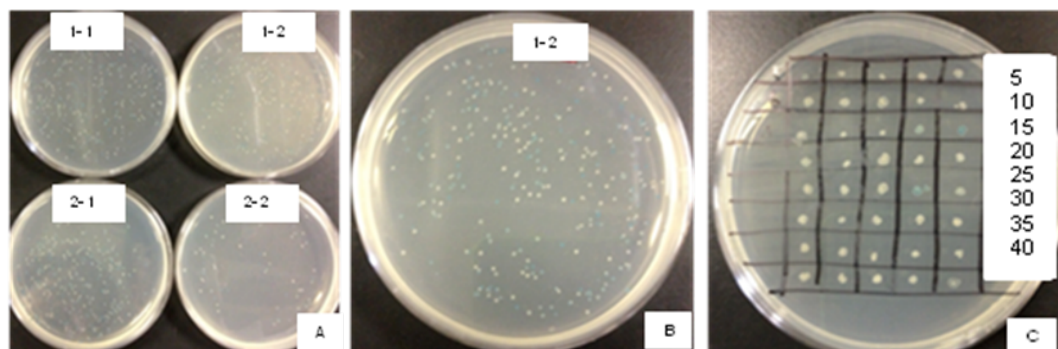
Chọn cùng mẫu Rn sản phẩm PCR đã DGGE ở phần trên thực hiện chèn vào vector pGEM[®]-T Easy và biến nạp vào *E. coli* JM109 theo qui trình kỹ thuật của hãng sản xuất Nippon Genetics.

Từ quá trình chuyển những đoạn gen V3

vào vector và biến nạp vào *E. coli* JM109 cho thấy sản phẩm thu nhận được ở Hình 4A, 4B trong đó có khuẩn lạc màu xanh và trắng. Điều này cho kết luận rằng khuẩn lạc có màu trắng đã được chuyển gen V3 thành công, vì đoạn gen V3 đã chèn vào giữa vùng gen *Lac Z* làm cho *Lac Z* không thể kết hợp với X-Gal trong môi trường LB để tạo khuẩn lạc có màu xanh mà là khuẩn lạc sẽ có biểu hiện màu trắng.



Hình 3. Kết quả ly trích và thu nhận bộ gen DNA cộng đồng vi sinh từ mẫu Rơm sau ủ Rn (A), sản phẩm PCR đoạn gene V3 cộng đồng vi sinh trên gel agarose 1% chạy trong 100volt/40phút (B), sản phẩm phân đoạn gene được tách theo phương pháp DGGE lần 1 chạy trong nguồn điện 200volt/300phút trên gel polyarylamide 40-60%(C) và tương tự DGGE lần 2 (D).



Hình 4. Kết quả khuẩn lạc có màu trắng thì đoạn gen đã chèn vào vector pGEM[®]-T Easy và vector đã biến nạp vào *E. coli* (A, B) và chọn khuẩn lạc có màu trắng cấy thuần tới đời F3 trên môi trường LB (C) có chứa Ampicillin, PIG và X-Gal.

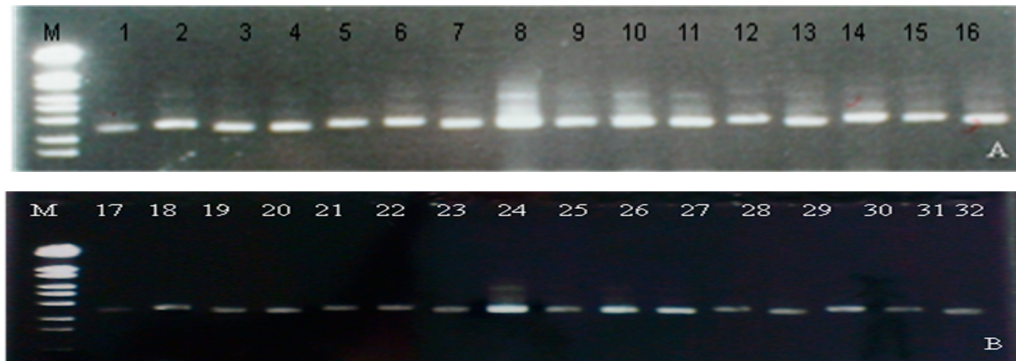
Kết quả này chứng minh rằng khuẩn lạc nào có màu trắng là khuẩn lạc đã chuyển thành công vector pGEM[®]-T Easy có chứa đoạn gen V3. Tiếp tục chọn khoảng 30 khuẩn lạc màu trắng

thực hiện cấy chuyển lặp lại 3 lần nhằm mục đích kiểm tra tính ổn định vector đã chuyển vào vi khuẩn *E. coli* JM109 mà không bị đào thải qua các vòng đời sinh sản của chủng *E. coli* JM109.

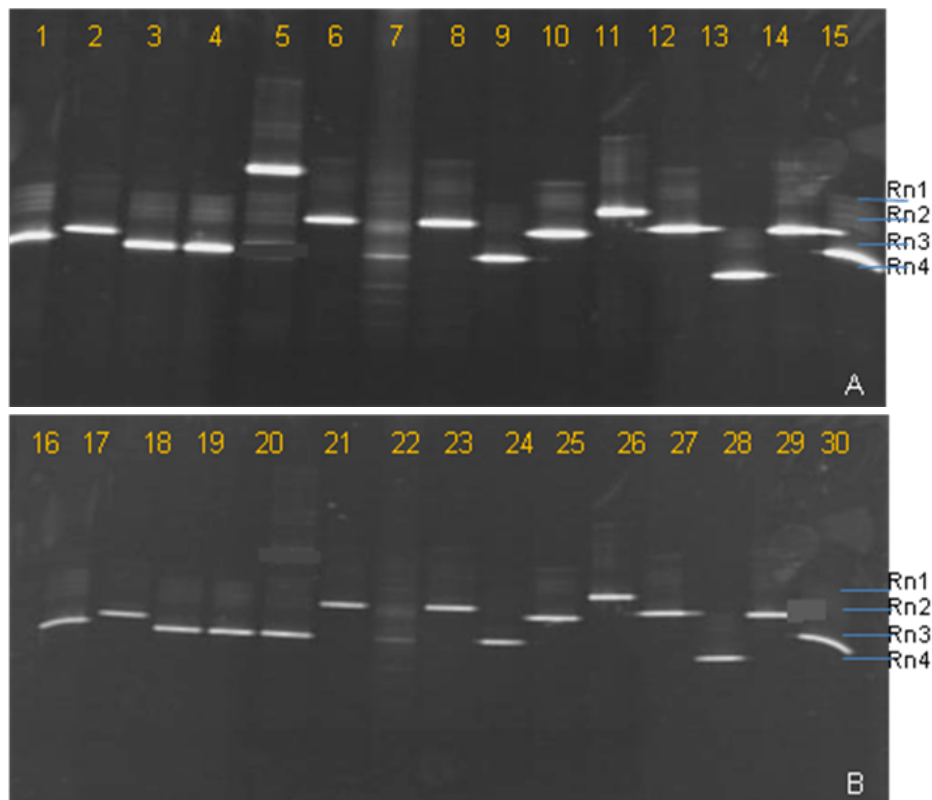
Ly trích, thu nhận và nhân bản lại đoạn gen V3 sau khi tạo dòng

Chọn khoảng 30 khuẩn lạc có màu trắng đã

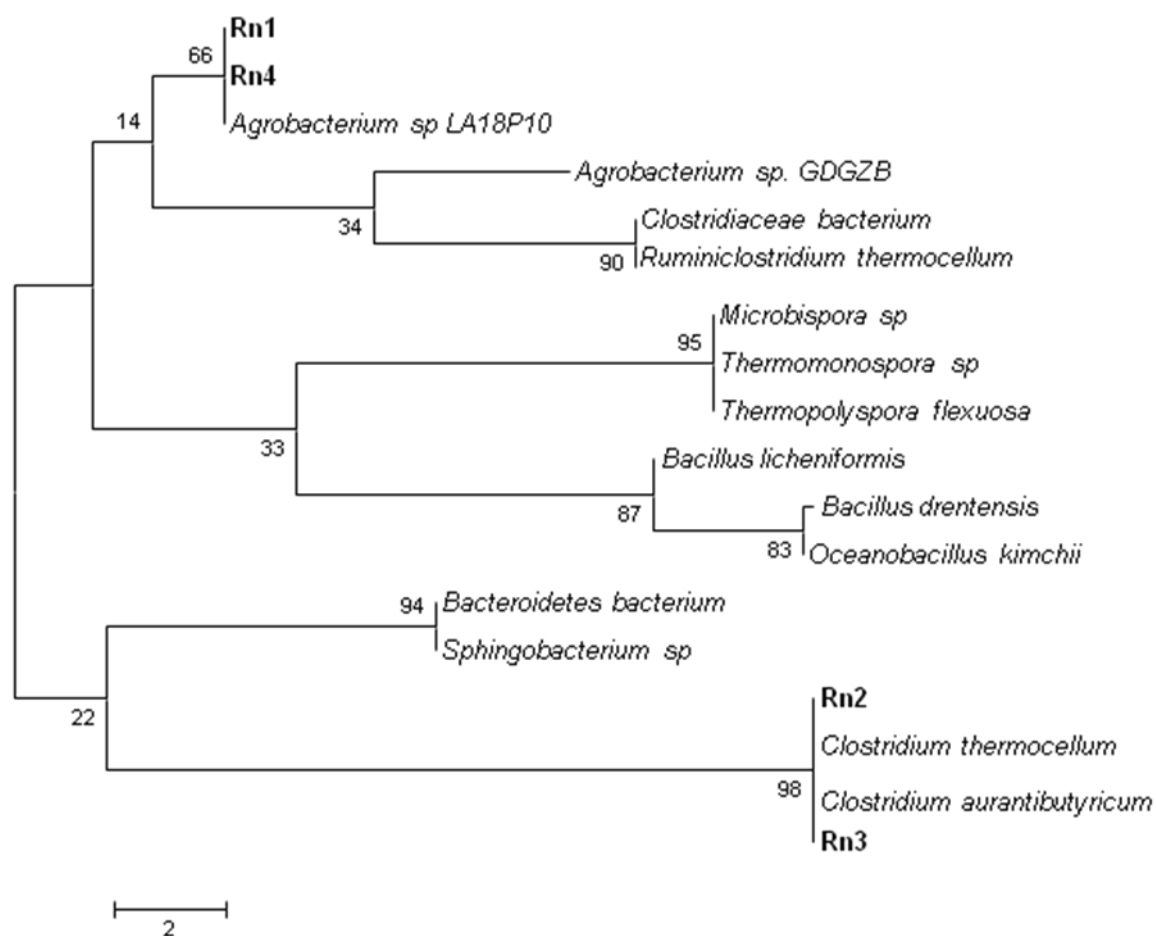
cấy thuần qua thể hệ F3 và sử dụng qui trình của QIAGEN plasmid kit tách chiết và thu nhận lại vector rồi sau đó PCR cho kết quả sản phẩm gen V3 ở Hình 5A, 5B.



Hình 5. Kết quả 32 sản phẩm PCR đoạn gen V3 thể hiện trên gel agarose 1% được ly trích và thu nhận từ vi khuẩn *E. coli* JM109 đã được cloning bằng vector pGEM[®]-T Easy (A và B).



Hình 6. Kết quả 30 sản phẩm DGGE chạy trên hệ thống BioRad trong nguồn điện 200volt/300phút trong nồng độ gel polyarylamide 40-60% (A, B).



Hình 7. Cây phát sinh loài dựa trên phân tích trình tự vùng gen V3 (Rn1, Rn2, Rn3 và Rn4) được phân lập mẫu Rơm chưa ủ (Rn) và các chủng vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI.

Kiểm tra sản phẩm gen V3 sau tạo dòng bằng kỹ thuật DGGE

Lấy kết quả sản phẩm PCR ở Hình 5A, 5B thực hiện phương pháp DGGE từ kết quả vị trí các mẫu gen cho thấy gen 5 tương ứng với vị trí gen Rn1, đoạn gen 11, 26 tương ứng gen Rn2, tương tự đoạn gen 6, 8, 10, 12, 14, 21, 23, 25, 27 và 29 tương ứng vị trí gen Rn3, phần còn lại là 1, 2, 3, 4, 9, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 27 và 30 tương ứng với gen Rn4. So sánh sản phẩm DGGE với hình 1.3D cho thấy vị trí các đoạn gen giữa phương pháp DGGE và tạo dòng điều cho kết quả giống nhau.

Chọn đại diện đoạn gen V3 của sản phẩm

tạo dòng tương ứng với vị trí đoạn gen Rn cho mẫu như sau; gen 5, gen 26, gen 8 và gen 3 xem Hình 6A, 6B của sản phẩm tạo dòng và Rn1, Rn2, Rn3, Rn4 của sản phẩm DGGE (Hình 3D) giải trình tự gen và so sánh kết quả các dữ liệu gen đoạn V3 trong ngân hàng dữ liệu NCBI với công cụ BLAST. Kết quả trình tự của đoạn gen 5 giống Rn1, gen 26 giống Rn2, gen 8 giống Rn3 và tương tự gen 3 với Rn4. Dựa vào so sánh tính tương đồng của mẫu các trình tự Rn với tham chiếu trong Genbank với từng mức cụ thể như sau; Kết quả cho thấy gen 5 (Rn1) tương đồng với chi *Agrobacterium* là 96%, gen 26 (Rn2) và gen 8 (Rn3) thuộc chi *Clostridium* với mức độ tương đồng gần với các loài

Clostridium thermocellum, *Clostridium aurantibutyricum* lần lượt tương ứng là 99%, 98% và gen 3 (Rn4) có mức độ tương đồng với chi *Agrobacterium* là 95% xem Hình 7.

Thông qua kỹ thuật PCR-DGGE và tạo dòng với kết quả thu được đều giống nhau ở mẫu Rn, còn lại hai dòng vi khuẩn *Clostridium*, *Agrobacterium* là chính. Vì trong giai đoạn rom ủ thì nhiệt độ đo được tăng trong khoảng 70°C và thời gian ủ kéo dài khoảng 20 ngày, làm cho sự hiện diện tính đa dạng dòng vi khuẩn không còn như mẫu rom ban đầu ở như kết quả phân tích ở Hình 1D và Hình 2.

Tóm lại, với mẫu Rn được thu nhận tại xã Tân Hòa, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp cho kết quả cùng sản phẩm PCR từ thu nhận DNA bộ gen và nhân bản đoạn gen V3 thuộc vùng 16S rDNA dựa trên cặp mồi chung là 357F-GC và 517R. Thông qua phân tích cộng đồng vi khuẩn bằng kỹ thuật DGGE cho 4 đoạn gen V3 là Rn1, Rn2, Rn3, Rn4. Kỹ thuật tạo dòng cũng cho 4 phân đoạn gen 5 tương ứng với vị trí gen Rn1, đoạn gen 11, 26 tương ứng gen Rn2, tương tự đoạn gen 6, 8, 10, 12, 14, 21, 23, 25, 27 và 29 tương ứng vị trí gen Rn3, phần còn lại là 1, 2, 3, 4, 9, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 27 và 30 tương ứng với gen Rn4. Ngoài ra mẫu R cho thấy tính đa dạng vi khuẩn trong mẫu chưa thông qua ủ khoảng 5 dòng và còn lại khoảng 2 dòng vi khuẩn sau giai đoạn ủ.

Từ kết quả nghiên cứu thu nhận được cho thấy có thể ứng dụng cả 2 hai kỹ thuật phân tích cộng đồng vi khuẩn là PCR-DGGE và tạo dòng cho việc phân tích cộng đồng vi khuẩn nói riêng và các nhóm vi sinh nói chung trong các loại mẫu khác nhau, trong điều kiện hệ vi sinh luôn luôn thay đổi và bên cạnh đó giúp các định hướng phân lập giống vi khuẩn và hỗ trợ cho các nghiên cứu tiếp theo từ kết quả trong phân tích kỹ thuật PCR-DGGE và tạo dòng.

KẾT LUẬN

Kết phân tích PCR-DGGE ở mẫu R và Rn cho thấy thành phần dòng vi khuẩn trong mẫu có sự thay đổi trước và sau ủ. Trong mẫu R thì

tính đa dạng loài nhiều hơn chi *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroidetes*, *Thermopolysporasa* và *Bacillus* như thiếu ổn định hơn mẫu Rn có chi *Agrobacterium*, *Clostridium* tính đa dạng chi vi khuẩn ít và phù hợp với các công bố trước đây do thời gian ủ, nhiệt độ ủ cũng làm giảm thành phần vi khuẩn trong mẫu.

Các kết quả tạo dòng của mẫu Rn cho một kết quả tương tự nhau ở vị trí, trình tự gen với phương pháp DGGE như gen Rn1 (gen 5) và gen Rn4 (gen 3) tương đồng với chi *Agrobacterium*, gen Rn2 (gen 26) và gen Rn3 (gen 8) thuộc chi *Clostridium*. Chứng tỏ rằng kết quả độc lập kỹ thuật PCR-DGGE và tạo dòng trong phân tích cộng đồng vi khuẩn cho giống nhau.

Kết luận việc sử dụng và so sánh giữa kỹ thuật PCR-DGGE và tạo dòng với mẫu Rn cho kết quả hoàn toàn giống nhau ở vị trí chạy trên gel acrylamide, trình tự gen trong các đoạn gen V3 trên mẫu Rn. Điều này có thể cho phép sử dụng độc lập kỹ thuật PCR-DGGE hoặc tạo dòng trong phân tích cộng đồng vi sinh vật hoặc kết hợp cả hai phương pháp với nhau.

Lời cảm ơn. Có được những kết quả nghiên cứu này chúng tôi nhờ sự hỗ trợ từ dự án “Kết hợp bền vững nền nông nghiệp địa phương với công nghiệp chế biến Biomass” của JICA, JST và Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh. Chân thành cảm ơn GS. Yasuo Igarashi và GS. Masahura Ishii và các đồng nghiệp tại GSALS, Đại học Tokyo Nhật Bản và Viện Sinh học nhiệt đới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cheon J, Hidaka T, Mori S, Koshikawa H, Tsuno H (2008) Applicability of random cloning method to analyze microbial community in full-scale anaerobic digesters. *J Biosci Bioeng* 106 (2): 134-40.
- Fischer SG, Lerman LS, (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1579-1583.

- Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y (2006) Direct comparison of single strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rDNA gene fragments. *J Microbiol Meth* (6): 165-169.
- Learn HL, Yoke KC, Shiran MS, Vui LCM, Nurul SAM, Son R, Andrade HM (2012) Identification of actinomycete communities in Antarctic soil from Barrientos Island using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Genet Mol Res* 11: 277-291.
- Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol*: 317-322.
- Muyzer G, De WEC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59(3): 695-700.
- Nghiêm Ngọc Minh (2004) Sử dụng kỹ thuật điện di trên gel gradient biến tính để nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* (2): 397-406.
- Ngô ĐD, Hoàng NPT, Hoàng QK, Nguyễn NT, Phan ĐT, Makoto A, Chihaya Y, Kouji Y, Yasuo I (2013) Sử dụng kỹ thuật PCR-DGGE phân tích cộng đồng vi khuẩn trong Rơm rạ tại huyện Lai Vung, Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 51(3A):1-16.
- Ngô ĐD, Nguyễn TTV, Đào TTH, Hoàng QK, Mannix P, Yamada C, Yoshida K, Igarashi Y (2012) Phân tích Cộng đồng vi khuẩn trong phân ủ bằng phương pháp DGGE. *Tạp chí Sinh học* 34(SE): 118-124.
- Nguyễn Bá Hữu, Đàm Thúy Hằng, Đặng Thị Cẩm Hà (2008). Xác định đa dạng vi khuẩn trong bùn hồ khu vực nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Đà Nẵng bằng kỹ thuật PCR-DGGE. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* (6): 59-65.
- Nguyễn Thanh Thủy, La Thị Phương, Đặng Thị Cẩm Hà (2004) Sử dụng phương pháp điện di gel gradient biến tính để xác định mức độ đa dạng của vi sinh vật trong các công thức thử nghiệm xử lý đất ô nhiễm chất độc hóa học. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* (2): 381-388.
- Okada H (2010) *Technical report on the PCR-DGGE analysis of soil Nematode community*. Ver.2.3.
- Salet S, Martin C, Meumier B, Morgavi DP (2007) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1(7): 939-945.
- Steger K, Sjogren AM, Jarvis A, Jansson JK, Sundh I (2007) Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. *J Appl Microbiol* (103): 487-498.
- Vila RC, Kazuo M, Susumu A, Makoto K (2003) Succession and phylogenetic composition of bacterial communities responsible for the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Soil Sci Plant Nut* (49): 619-630
- Watanabe T, Asakawa S, Nakamura A, Nagaoka K, Kimura M (2004) DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiol Lett* 232: 15-163.

BACTERIAL COMMUNITY ANALYSIS IN THE RICE STRAW SAMPLE BEFORE AND AFTER COMPOSTING BY PCR-DGGE AND CLONING METHOD

Ngo Duc Duy, Nguyen Hoang Dung, Hoang Quoc Khanh

Institute of Tropical Biology (ITB), Vietnam Academy of Sciences and Technology (VAST)

SUMMARY

Applicability of PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) technique to analyze microbial community is based on the V3 gene fragments in the rice straw sample (R) and after composting rice straw samples (Rn). Besides cloning method combined with analyzing Rn samples and comparing the results of microbial community analysis

with PCR-DGGE method had the same results is the main goal in this study. Results obtained from PCR-DGGE technique of R sample had 5 the V3 gene fragments (R1, R2, R3, R4 and R5) and Rn had 4 the V3 genes fragments (Rn1, Rn2, Rn3 and Rn4). Comparison of bacterial groups in R and Rn samples showed that bacteria in R samples including *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroidetes*, *Thermopolysporasa* and *Bacillus* species, but in the Rn sample after incubation, the remaining bacterial results of 2 main species are *Agrobacterium* and *Clostridium*. Using Cloning method of Rn sample also gave 4 positions and gene fragment sizes corresponding to the positions of Rn1, Rn2, Rn3 and Rn4 from representatives of about 30 samples collected from the Cloning products. Based on the comparison of the similarity among the sequence of V3 gene fragments in PCR-DGGE and Cloning with reference to the data base in NCBI gene bank the results that Rn1 and Rn4 genes are similar to *Agrobacterium* species, about 96%, Rn2 and Rn3 are similar to *Clostridium* about 99%. In summary the results of microbial community analysis in the R sample show that the diversity of bacteria in the R sample is larger than in the Rn sample. Summarize the results of microbial community analysis in the R sample show the diversity of bacteria but less stable than the Rn sample. In addition, cloning and PCR-DGGE produced similar results on the sample Rn.

Keywords: *bacterial community, cloning, gel acrylamide, PCR-DGGE, rice straw*