

# Đa dạng vi khuẩn khử nitrat trong một số môi trường sinh thái ở Việt Nam và các chủng đại diện

Nguyễn Thị Tuyền<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Giảng<sup>2</sup>, Vũ Hoàng Giang<sup>3</sup>, Đinh Thúy Hằng<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

<sup>3</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga, Bộ Quốc Phòng, Nguyễn Văn Huyên, Hà nội

Nhận ngày 14 tháng 1 năm 2009

**Tóm tắt.** Vi khuẩn sinh trường kỵ khí khử nitrat (Nitrate Reducing Bacteria - NRB) tại một số dạng môi trường sinh thái ở Việt Nam, cụ thể là thủy vực nước ngọt, bể xử lý nước thải và đầm nuôi tôm thủy sản ven biển được đánh giá về số lượng và mức đa dạng. Kết quả nghiên cứu cho thấy số lượng NRB cao nhất trong thủy vực nước ngọt và thấp nhất trong mẫu lấy từ bể xử lý nước thải. 12 chủng NRB được phân lập từ ba dạng môi trường sinh thái trên thể hiện tính đa dạng di truyền cao theo phân tích RFLP 16S rADN sử dụng hai enzyme *HaeIII* và *MspI*. Mẫu thủy vực nước ngọt, bể xử lý nước thải và đầm nuôi tôm thủy sản ven biển được sử dụng trong thí nghiệm làm giàu NRB với nguồn cơ chất Na-lactat và Na-benzoat. Phân tích điện di biến tính (DGGE) tập hợp NRB trong các mẫu làm giàu cho thấy tính đa dạng cao, trong đó *Ochrobactrum* và *Paracoccus* là hai nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế ở mỗi tập hợp. Hai chủng đại diện *Ochrobactrum* sp. LF1 và *Paracoccus* sp. BB3 được phân lập và nghiên cứu khả năng loại bỏ nitrat trong môi trường nuôi cấy.

**Từ khóa:** Anaerobic Nitrate Reducing Bacteria, RFLP, DGGE.

## 1. Mở đầu

Ô nhiễm hữu cơ trong nước thải công nghiệp, sinh hoạt hay từ các làng nghề sản xuất và chế biến thực phẩm ở nước ta hiện nay đã lên tới mức báo động. Không những nước bề mặt mà cả tầng nước ngầm tại một số vùng đã bị nhiễm bẩn nghiêm trọng (Báo cáo hiện trạng môi trường Quốc gia, 2005), gây ảnh hưởng

trực tiếp đến sức khỏe cộng đồng vì đó là căn nguyên gây đột biến về gen, gây các bệnh ung thư và thiếu máu ở người và động vật [1].

Trong quy trình xử lý loại bỏ nitơ từ nước thải, NRB đảm nhiệm chức năng chuyển nito dạng hòa tan có hại sang dạng khí vô hại trước khi thải ra ngoài môi trường. Quá trình khử nitrat diễn ra trong tế bào vi sinh vật gồm nhiều bước ( $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ), mỗi bước do một loại enzyme trong tế bào làm xúc tác [1, 2]. Trong tự nhiên, vi khuẩn có khả năng sinh trưởng bằng cách khử nitrat tương đối đa

\* Tác giả liên hệ. ĐT: +84 4 37547694  
E-mail: [dthang@vnu.edu.vn](mailto:dthang@vnu.edu.vn)

dạng, thuộc nhiều nhóm phân loại khác nhau [2]. Nguồn điện tử cho các loại vi sinh vật này sử dụng để khử nitrat cũng rất phong phú, bao gồm các axit hữu cơ, cacbua hydro mạch thẳng hay mạch vòng, kể cả một số chất khó phân hủy [2]. Trong môi trường nước ngọt nitrat là chất nhận điện tử quan trọng thứ hai sau ôxy, vì thế quần thể NRB ở đây cũng đa dạng hơn so với môi trường nước lợ và nước mặn, nơi có vi khuẩn khử sulfat chiếm ưu thế do ảnh hưởng của nồng độ  $\text{SO}_4^{2-}$  cao từ nước biển.

Mặc dù đóng vai trò rất quan trọng trong chu trình nitơ và cacbon, cũng như trong các quy trình xử lý nguồn thải ô nhiễm nhưng cho đến nay chưa có một nghiên cứu nào đề cập đến bức tranh đa dạng của NRB tại Việt Nam. Nghiên cứu này được chúng tôi tiến hành với mục tiêu tìm hiểu tính đa dạng của NRB trong một số dạng môi trường sinh thái đại diện ở nước ta để làm cơ sở cho việc ứng dụng chúng vào mục đích môi trường sau này.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp

### 2.1. Địa điểm và phương pháp thu mẫu

Mẫu nước hoặc bùn đáy tại một số dạng thủy vực, bao gồm hồ Ba Mẫu (Hà Nội), đầm nuôi tôm (Quảng Ninh) và bể xử lý nước thải (Thanh Hóa) được thu thập trong các bình thủy tinh nút xoáy với toàn bộ thể tích bình để giảm thiểu sự ảnh hưởng của ôxy không khí tới quần thể vi sinh vật kỵ khí trong mẫu. Mẫu được bảo quản tại nhiệt độ 4 °C cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

### 2.2. Đếm, nuôi tích lũy và phân lập NRB

Số lượng NRB trong các mẫu thu thập được xác định thông qua phương pháp MPN (Most Probable Number) [3] trên môi trường kỵ khí

chứa  $\text{NaNO}_3$  (5 mM) làm chất nhận điện tử và Na-lactat hoặc Na-Benzoat (10 mM) làm chất cho điện tử.

Mẫu nước hoặc bùn đáy được sử dụng làm nguồn ban đầu để nuôi tích lũy NRB với thể tích 10% trong môi trường khoáng dịch thể chứa  $\text{NaNO}_3$  (5 mM) làm chất nhận điện tử duy nhất và hai nguồn điện tử khác nhau là Na-lactat và Na-benzoat (10 mM). Môi trường dịch thể kỵ khí hoàn toàn, với thành phần khoáng tương ứng với nước ngọt (dùng cho mẫu từ hồ Ba Mẫu và bể xử lý nước thải) và nước lợ (dùng cho mẫu lấy từ đầm nuôi tôm ở Quảng Ninh) được chuẩn bị theo phương pháp do Widdel và Bak mô tả [4]. Mẫu được ủ trong tủ nuôi cấy tại 28 °C và chuyển sang môi trường mới 5 ngày 1 lần.

NRB được phân lập theo phương pháp tiến hành pha loãng trên dãy ống thạch bán lỏng (1%) [4] với môi trường có thành phần tương tự như môi trường dùng trong thí nghiệm nuôi tích lũy. Ống thạch sau khi bổ sung nguồn vi sinh vật từ dịch nuôi tích lũy được sục khí  $\text{N}_2$  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) và nguồn chất cho điện tử tương ứng (Na-lactat hay Na-benzoat).

### 2.3. Tách ADN tổng số và nhân gen 16S rADN của chủng đơn

ADN tổng số từ chủng đơn được tách chiết theo phương pháp của Marmur và cs. [5] với một số thay đổi để tối ưu hóa thí nghiệm. Gen mã hóa cho 16S rARN (1500 bp) được nhân 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). Sản phẩm PCR được sử dụng làm

khuôn cho phản ứng cắt bằng enzym giới hạn và phân tích đa dạng theo phương pháp RFLP.

#### 2.4. Phân tích đa dạng của các chủng đơn phân lập được bằng phương pháp RFLP

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) là phương pháp thường được sử dụng để nghiên cứu mức độ đa dạng về di truyền của một nhóm VSV dựa trên phân tích kết quả xử lý gen bằng một hoặc nhiều enzyme giới hạn, cụ thể là gen mã hóa cho 16S rARN trong nghiên cứu này. Gen 16S rADN của các chủng đơn sau khi được khuếch đại trong phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F và 1492R được xử lý bằng hai enzym giới hạn *MspI* và *HaeIII* (Fermentas). Sản phẩm ADN sau khi đã xử lý enzym được phân tách bằng điện di trên gel agarose 2% tại 100 V trong thời gian 60 phút. Các chủng vi khuẩn sẽ được xếp nhóm dựa trên sự tương đồng về phổ các băng điện di. Các chủng vi khuẩn đại diện cho mỗi nhóm sẽ được phân tích trình tự để định danh khoa học.

#### 2.5. Phân tích thành phần loài trong quần thể vi sinh vật bằng điện di biến tính

ADN tổng số từ mẫu bùn, mẫu nuôi tích lũy NRB được tách chiết theo phương pháp do Zhou và cs. mô tả [6] với một số cải biến. Đoạn ADN dài 550bp của gen mã hóa cho 16S rARN 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) [7]. Để tạo tính ổn định cho việc phân tách các trình tự ADN trên gel điện di biến tính, kẹp GC gồm 40 bp được gắn vào đầu 5' của mồi GM5F. Điện di được tiến hành trên gel polyacrylamid 6% với dải biến tính urea/formamid từ 20% đến 70%. Quá trình điện di được thực hiện ở nhiệt độ 60 °C tại 200 V trong 3.5 h. Sau khi điện di, gel polyacrylamid

được nhuộm trong dung dịch ethidium brommid (5mg/ml) trong 30 phút, sau đó rửa nước và chụp ảnh dưới tia UV trên máy GelDoc (BioRad).

#### 2.6. Giải trình tự

Các băng DGGE đại diện được cắt và thổi ADN trong 50 µl nước qua đêm tại 4 °C. ADN thổi từ gel điện di biến tính được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi GM5F (không gắn kẹp GC) và 907R. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit QuiaQuick (QuiaGen), sau đó được xác định trình tự sử dụng ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và máy đọc trình tự tự động 3110 Avant Applied Biosystems. Kết quả được phân tích so sánh với trình tự gen 16S rADN của các loài có liên quan hiện đã công bố trên Database GenBank sử dụng phần mềm BLAST Search.

#### 2.7. Xác định nồng độ nitrat trong môi trường nuôi cấy

Các chủng NRB được nuôi cấy trên môi trường kỵ khí dạng dịch thể chứa nitrat (5 mM) trong bình serum đầy kín bằng nút cao su. Mẫu dịch nuôi cấy (5 ml) được thu thập sau mỗi 24 h và xác định nồng độ nitrat bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử axit desulfofemic [8].

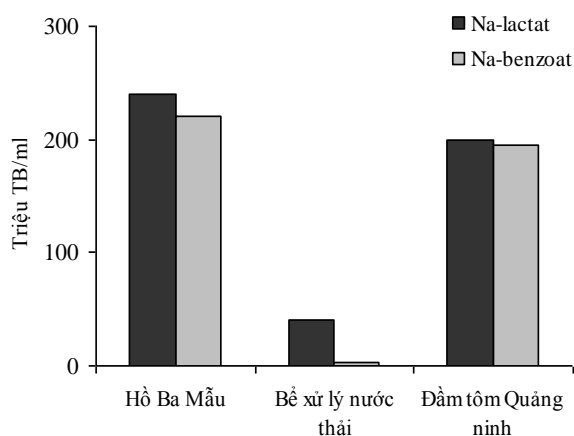
### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Xác định số lượng NRB trong các mẫu thu thập

Số lượng NRB với khả năng ôxy hóa Na-lactat hoặc Na-benzoat kết hợp khử nitrat trong 3 mẫu bùn đáy thu thập tại các môi trường sinh thái khác nhau được xác định thông qua phương

pháp MPN sử dụng môi trường dịch thể có thành phần khoáng tương ứng với môi trường tại địa điểm lấy mẫu. Kết quả được trình bày trên hình 1.

Đồ thị trên hình 1 cho thấy số lượng NRB trong mẫu thu thập từ hồ Ba Mẫu và đầm nuôi tôm khá cao, trên  $10^8$  tế bào trong 1 ml mẫu. Hồ Ba Mẫu có số lượng NRB cao hơn so với mẫu từ đầm nuôi tôm Quảng Ninh. Điều này có thể giải thích bằng sự cạnh tranh của các nhóm kỵ khí sulfat cao [2]. Đặc biệt, số lượng NRB trong bể xử lý nước thải thấp hơn ở hai mẫu còn lại khoảng 10 đến 100 lần, chứng tỏ các yếu tố môi trường trong hệ thống này không thích hợp cho quá trình khử nitrat. Trong hai chất hữu cơ sử dụng làm nguồn cho điện tử thì số NRB sử dụng Na-lactat (muối của axit hữu cơ mạch thẳng) cao hơn số lượng NRB sử dụng Na-benzoat (muối của axit hữu cơ mạch vòng).



Hình 1. Số lượng NRB trong các mẫu thu thập từ các môi trường sinh thái khác nhau

### 3.2. Phân lập các chủng NRB đại diện

Bảng 1. Các chủng NRB đại diện phân lập được trong nghiên cứu

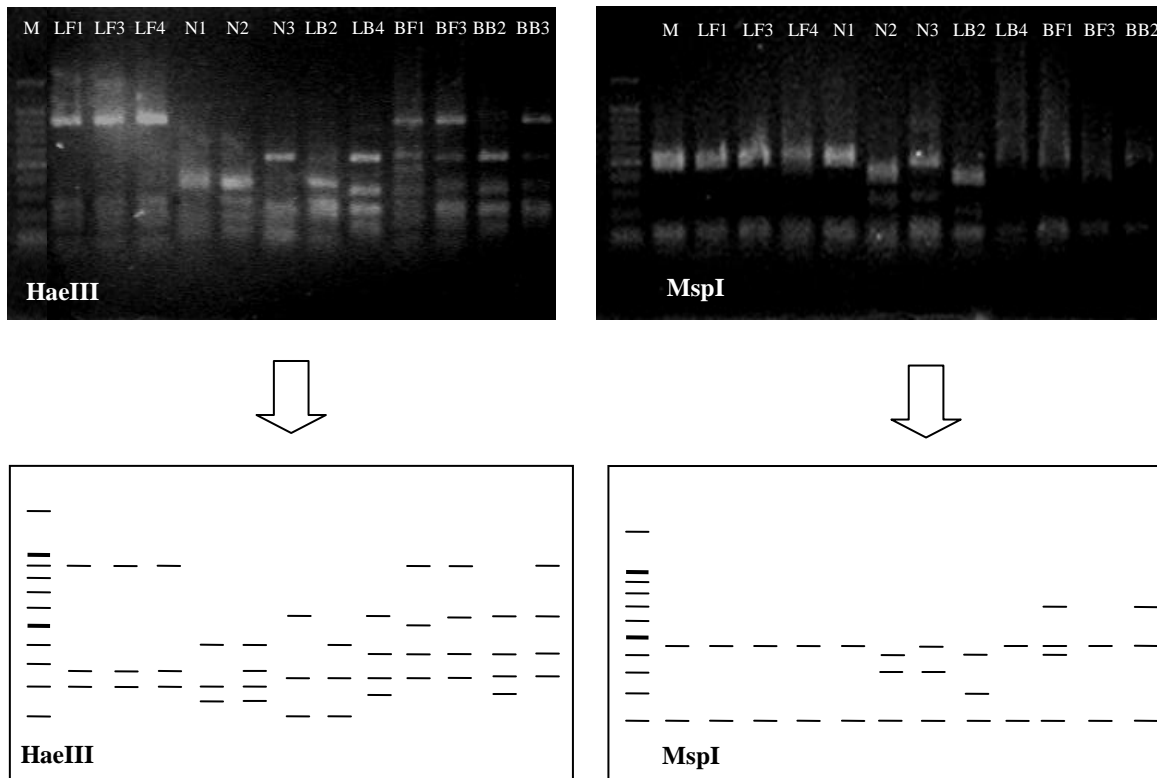
STT	Tên chủng	Nguồn phân lập	Cơ chất	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc
1	LF1	Hồ Ba Mẫu	Na-lactat	Màu vàng nâu, hình sao ba cánh, kích thước 0,5mm
2	LF3	Hồ Ba Mẫu	Na-lactat	Màu trắng sữa, hình đĩa, kích thước 0,5 mm
3	LF4	Hồ Ba Mẫu	Na-lactat	Màu trắng sữa, hình cầu, kích thước 1 mm
4	N1	Bể xử lý nước thải	Na-lactat	Màu hồng nhạt, hình đĩa dẹt, kích thước 0,3-0,5mm
5	N2	Bể xử lý nước thải	Na-lactat	Màu trắng đục, hình đĩa lồi, kích thước 0,8 mm
6	N3	Bể xử lý nước thải	Na-lactat	Màu trắng đục, hình đĩa dẹt, kích thước 2 mm
7	LB2	Đầm tôm Quảng Ninh	Na-lactat	Màu trắng sữa, hình đĩa lồi, riềm nhẵn, kích thước 1 mm
8	LB4	Đầm tôm Quảng Ninh	Na-lactat	Màu trắng ngả xanh, hình đĩa lồi, riềm trơn, kích thước 1 mm
9	BF1	Hồ Ba Mẫu	Na-benzoat	Màu trắng, hình cầu, kích thước 0,5 mm
10	BF3	Bể xử lý nước thải	Na-benzoat	Sẫm màu, khuẩn lạc nhỏ, kích thước 0,5 mm
11	BB2	Đầm tôm Quảng Ninh	Na-benzoat	Màu trắng đục, có hình không gian đặc trưng, kích thước 1 mm
12	BB3	Đầm tôm Quảng Ninh	Na-benzoat	Màu be nhạt, hình oval, kích thước 1 mm

Các chủng NRB đại diện cho quần thể NRB trong các mẫu nghiên cứu được phân lập từ ống MPN ở độ pha loãng cao nhất có tế bào sinh trưởng thông qua phương pháp pha loãng trên ống thạch bán lỏng (1%) kỵ khí. Dựa trên sự khác nhau về hình thái khuẩn lạc hình thành trong ống thạch, điểm thu mẫu và nguồn cơ chất, 12 chủng NRB đại diện đã được phân lập trong nghiên cứu này (Bảng 1).

### 3.3. Phân tích tính đa dạng của các chủng NRB đại diện bằng phương pháp RFLP

Tính đa dạng của 12 chủng NRB được phân tích dựa trên sự so sánh phổ băng điện di sau khi xử lý sản phẩm ADN của gen 16S rADN bằng enzym giới hạn *HaeIII* và *MspI*

(hình 2). Kết quả thu được cho thấy các chủng NRB đã phân lập đại diện cho các nhóm rất khác nhau về mặt di truyền. Phối hợp kết quả phân tích bằng cả hai enzym, 12 chủng này được xếp vào 10 nhóm khác nhau (bảng 2). Ngoại trừ nhóm 1 bao gồm 3 chủng cùng được phân lập từ hồ Ba Mẫu với chất cho điện tử là Na-Lactat, các nhóm còn lại đều gồm các chủng hoặc có nguồn gốc khác nhau, hoặc được phân lập với các chất cho điện tử khác nhau. Như vậy tính đa dạng về di truyền của các chủng NRB phân lập được trong nghiên cứu này hoàn toàn không phụ thuộc vào địa điểm thu mẫu ban đầu cũng như nguồn điện tử đã dùng để phân lập.



**Hình 2.** Phổ điện di 16S rADN của 12 chủng NRB sau khi xử lý bằng enzym giới hạn *MspI* và *HaeIII*

Bảng 2. Tính đa dạng về di truyền của 12 chủng NRB đã phân lập dựa trên RFLP

Nhóm	Chủng	Các đoạn ADN tạo ra sau khi xử lý 16S rADN bằng enzym giới hạn (bp)					
		Enzym <i>HaeIII</i>			Enzym <i>MspI</i>		
1	LF1						
	LF3	200	280		900		
	LF4						
2	N1	150	200	400		100	450
3	N2	150	200	280	400		
4	BF1		250	350	500	550	900
5	BB2						
6	LB4	180	250	350		550	
							100 200 400
7	LB2	100	250	400			100 300 450
8	N3	100	250		550		100 300 400
9	BF3						100 400 450 700
			250	350		550 900	
10	BB3						100 450 700

3.4. Tính đa dạng của NRB thể hiện qua phân tích bằng điện di biến tính (DGGE)

Theo kết quả phân tích ở trên, mẫu thu thập từ hồ Ba Mẫu có số lượng NRB cao nhất trong ba dạng môi trường nghiên cứu. Trên cơ sở đó thí nghiệm nuôi tích lũy NRB với mẫu bùn này sử dụng nguồn cho điện tử là Na-lactat hoặc Na-benzoat được thiết lập nhằm xác định các nhóm có vai trò quan trọng trong quá trình khử nitrat tại môi trường sinh thái đã lựa chọn.

Các mẫu nuôi tích lũy được ký hiệu là L0, L1, L2 đối với nguồn cho điện tử là Na-lactat; là B0, B1, B2 đối với nguồn cho điện tử là Na-benzoat, trong đó số thứ tự 0, 1, 2 thể hiện quần thể NRB qua 3 lần cấy truyền trên môi trường làm giàu. Đoạn ADN 550 bp của gen mã hóa cho 16S rARN của các mẫu nuôi tích lũy được phân tách trên gel polyacrylamid

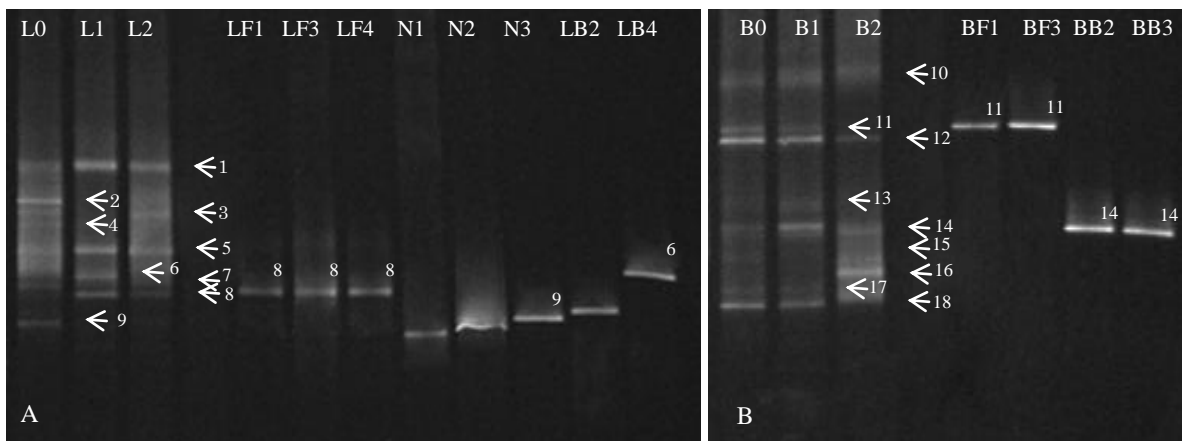
6% với dải biến tính ure/formamid từ 20% đến 70%. Bên cạnh đó, đoạn ADN tương ứng khuếch đại từ 12 chủng đơn cũng được phân tích đồng thời trên gel điện di biến tính để so sánh với các băng đại diện cho các nhóm trong quần thể NRB của mẫu nuôi tích lũy (hình 3).

Phổ băng DGGE trong các mẫu nuôi tích lũy thay đổi một cách rõ rệt. Có thể nhận thấy xu hướng giảm số băng (hay số nhóm vi khuẩn trong quần thể) qua các lần cấy truyền. Với nguồn cho điện tử là Na-lactat, nhóm vi khuẩn ở băng số 1, 5 và 8 tăng đáng kể, chứng tỏ các nhóm này thích nghi nhất với điều kiện của thí nghiệm là dùng Na-lactat để khử nitrat. Một số nhóm khác thể hiện xu hướng giảm về số lượng (các băng số 2, số 9), không ổn định (băng số 6) hoặc xuất hiện muộn ở lần cấy truyền cuối cùng (băng số 3 và số 7). Kết quả so sánh với các chủng đơn cho thấy đại diện

của các nhóm ở băng số 6 (LB4), băng số 8 (các chủng LF1, LF3, LF4) và băng số 9 (N2) đã được phân lập và tinh sạch. Nhóm 3 chủng LF1, LF3 và LF4 có cùng đặc tính di truyền, thống nhất với kết quả phân tích RFLP ở trên. Các chủng này đại diện cho nhóm vi khuẩn ở băng số 8, là nhóm đóng vai trò quan trọng trong quần thể NRB trong mẫu nghiên cứu. Chủng LF1 được lựa chọn để tiến hành phân tích hoạt tính sinh học trong thí nghiệm tiếp theo.

Với nguồn cho điện tử là Na-benzoat, số băng của các mẫu B0, B1, B2 lần lượt là 8, 7 và 5 băng. Điều này chứng tỏ, đã có sự tích lũy những băng đại diện cho những loài NRB chiếm ưu thế, sử dụng Na-lactat và Na-benzoat làm nguồn cho điện tử. Các nhóm vi khuẩn thuộc các băng điện di 10, 12, 14 và 18 được duy trì qua các lần cấy truyền, chứng tỏ đây là

các nhóm đã chiếm số đông trong mẫu ban đầu và tiếp tục thích nghi được với điều kiện làm giàu trong thí nghiệm. Nhóm vi khuẩn ở băng số 11 không tiếp tục được duy trì ở lần cấy truyền cuối cùng, như vậy nhóm này không đóng vai trò quan trọng trong mẫu làm giàu. Ngược lại, hai nhóm vi khuẩn ở băng số 15 và 16 chỉ có thể quan sát thấy một cách rõ rệt ở mẫu làm giàu B3, do vậy đây là những nhóm được tích lũy trong thí nghiệm qua các lần cấy truyền và đóng vai trò chính trong mẫu làm giàu. Điện di so sánh với các mẫu chủng đơn cho thấy đại diện của nhóm ở băng số 11 (chủng BF1, BF3) và nhóm ở băng số 4 (BB2, BB3) đã được phân lập và tinh sạch. Chủng BB3 đại diện cho nhóm vi khuẩn ở băng điện di 14 được lựa chọn để tiến hành phân tích hoạt tính sinh học cùng với chủng LF1 ở trên (hình 4).



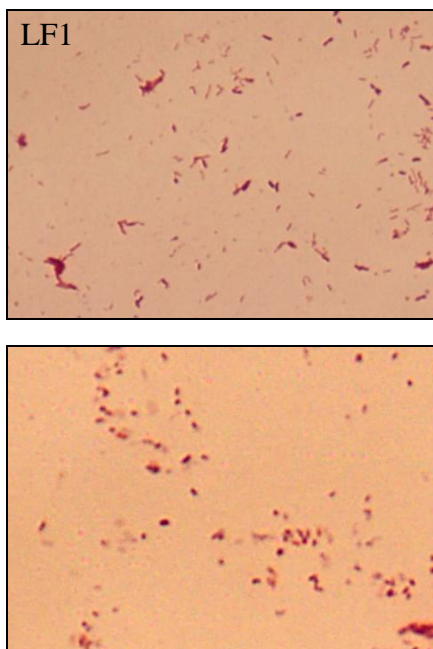
**Hình 3.** Phổ băng điện di biến tính (DGGE) của các mẫu nuôi tích lũy và các chủng đơn tương ứng (A) Na-lactat: L0-L2 là kí hiệu các mẫu nuôi tích lũy; LF1, LF3, LF4, N1, N2, N3, LB2, LB4 là kí hiệu các chủng đơn. (B) Na-benzoat: B0-B2 là kí hiệu các mẫu nuôi tích lũy; BF1, BF3, BB2, BB3 là kí hiệu các chủng đơn. 1-18: tên các băng điện di

### 3.5. Nghiên cứu hoạt tính khử nitrat và các đặc điểm phân loại ở hai chủng LF1 và BB3

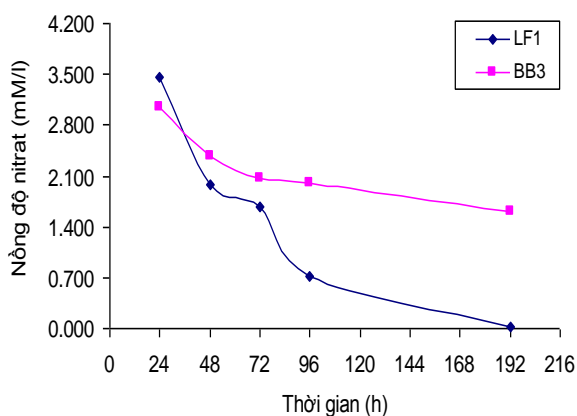
Hoạt tính khử nitrat của hai chủng LF1 và BB3 được xác định ở điều kiện kỵ khí với nitrat làm chất nhận điện tử cuối cùng và Na-

lactat hoặc Na-benzoat làm nguồn carbon và năng lượng. Sự giảm nồng độ nitrat trong môi trường (hình 5) cho thấy tốc độ khử nitrat của chủng LF1 cao hơn đáng kể so với chủng BB3, và sử dụng toàn bộ lượng nitrat có trong môi trường sau 1 tuần. Tuy nhiên, cũng phải lưu ý

rằng trong hai cơ chất sử dụng trong thí nghiệm thì benzoat khó bị phân hủy hơn lactat.



Hình 4. Hình thái tế bào của hai chủng LF1 và BB3



Hình 5. Khả năng khử nitrat của hai chủng LF1 và BB3

Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi cho thấy chủng LF1 gồm các tế bào dạng trực khuẩn ngắn, kích thước 1 x 3 - 4  $\mu\text{m}$ , trong khi đó chủng BB3 gồm các tế bào dạng oval có

kích thước 1 x 1,5  $\mu\text{m}$  (hình 4). Giải trình tự gen mã hóa cho 16S rARN của hai chủng này và so sánh với ngân hàng dữ liệu GenBank cho phép chúng tôi xếp chủng LF1 vào chi *Ochrobactrum* (loài gần gũi nhất là *O. cytisi*, 99% tương đồng) và chủng BB3 vào chi *Paracoccus* (loài gần gũi nhất là *Paracoccus sp.* KS-11, 96% tương đồng). Cả hai chi *Ochrobactrum* và *Paracoccus* đều thuộc lớp  $\alpha$  - *Proteobacteria* và gồm nhiều loài có khả năng hô hấp với nitrat trong điều kiện không có oxy [2].

#### 4. Kết luận

Từ những kết quả phân tích ở trên, chúng tôi xin đưa ra một số kết luận chính sau đây:

- Số lượng NRB trong mẫu thu thập từ hồ Ba Mẫu và đầm nuôi tôm Quảng Ninh khá cao (trên  $2.10^8$  tế bào trong 1 ml mẫu), trong đó hồ Ba Mẫu có số lượng NRB cao hơn so với đầm nuôi tôm Quảng Ninh. Còn số lượng NRB trong bể xử lý nước thải thấp hơn ở hai mẫu còn lại khoảng 10 đến 100 lần.

- 12 chủng NRB phân lập được từ các môi trường sinh thái khác nhau thể hiện tính đa dạng cao thông qua phương pháp RFLP (với hai enzym cắt giới hạn): 3 chủng LF1, LF3 và LF4 thuộc một nhóm, còn 9 chủng còn lại thuộc vào 9 nhóm khác nhau.

- Các tập hợp loài NRB với mức đa dạng cao đã được tạo ra qua thí nghiệm nuôi tích lũy với mẫu bùn đáy ở hồ Ba Mẫu sử dụng Na-lactat hoặc Na-benzoat làm chất cho điện tử để khử nitrat. Với cơ chất là lactat, *Ochrobactrum* là một nhóm ưu thế, trong khi đó với cơ chất là Na-benzoat thì *Paracoccus* là một nhóm chiếm ưu thế.

- Hai chủng đại diện cho hai nhóm chiếm ưu thế trong mỗi mẫu làm giàu LF1 (cơ chất lactat) và BB3 (cơ chất benzoat) đã được phân



lập. Các chủng này thể hiện khả năng khử nitrat cao và có tiềm năng ứng dụng trong việc loại bỏ nitrat trong nước ô nhiễm. So sánh trình tự 16S rARN cho phép định danh chủng LF1 là *Ochrobactrum sp.* LF1 và chủng BB3 là *Paracoccus sp.* BB3.

### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài KHCB, mã số 621506. Tác giả xin trân trọng cảm ơn Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN đã tạo điều kiện trong quá trình thực hiện đề tài.

### Tài liệu tham khảo

- [1] Bitton G., *Wastewater microbiology*, 2nd Ed., Wiley-Liss Inc., USA, 1999.
- [2] Shapleigh J. P., *The prokaryotes: an Evolving electronic resource for the microbiological community*, The Denitrifying Prokaryotes, In Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackbrandt E., eds., Springer-Verlag, New York, 2000.
- [3] American Public Health Association, Standard methods for the examination of water and waste water including bottom sediments and sludge, Pp. 604 - 609, 1961.
- [4] Widdel F., Bak F., *The Prokaryotes*, 2nd Ed., vol. 1, Gram negative mesophilic sulfate reducing bacteria, In Balows A., Trueper G. H., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H., eds., Pp. 3352 - 3378, Springer-Verlag, New York, 1992.
- [5] Marmur J., A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 208.
- [6] Zhou J., Bruns M. A., Tiedje J. M., DNA recovery from soils of diverse composition, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (1996) 316-322.
- [7] Muyzer G., De Waal E. C., Uitterlinden A. G., 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 (1993) 695.
- [8] Lê Đức, *Một số phương pháp phân tích môi trường*, NXB ĐHQGHN, 2004.

## Study nitrate reducing bacteria in some ecological habitats in Vietnam and representative strains

Nguyễn Thị Tuyền<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Giang<sup>2</sup>, Thái Hoàng Giang<sup>3</sup>, Đinh Thuy Hằng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>University of Natural Sciences, VNU

<sup>2</sup>Institute of Microbiology and Biotechnology, VNU

<sup>3</sup>Vietnam-Russia Tropical Center, MOD

**Abstract.** Anaerobic nitrate reducing bacteria (NRB) in some ecological habitats in Vietnam, such as freshwater aquifer, wastewater treatment tank and shrimp pond were quantified and studied on their diversity. It is revealed that the number of NRB was highest in freshwater aquifer and lowest in wastewater treatment tank. 12 strains isolated from the above three habitats showed high diversity as revealed by RFLP analysis of 16S rDNA with two restriction enzymes *HaeIII* and *MspI*. The mud

sample from the freshwater aquifer was used in the enrichment experiment of NRB with lactate or benzoate as electron donor. DGGE analyses of 16S rDNA in the enrichment cultures showed relatively high diversity of NRB, among them *Ochrobactrum* and *Paracoccus* were the main groups. Two representative strains *Ochrobactrum* sp. LF1 and *Paracoccus* sp. BB3 were isolated and studied for their capability of nitrate elimination in the culture media.

*Keywords:* Anaerobic Nitrate Reducing Bacteria, RFLP, DGGE.