

**SỬ DỤNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ XÁC ĐỊNH VI KHUẨN
ANAMMOX TRONG SINH KHỐI CỦA HỆ THỐNG LÀM GIÀU ANAMMOX
TẠI VIỆN NGHIÊN CỨU DA GIÀY, BỘ CÔNG THƯƠNG**

Đến tòa soạn 14 – 7 – 2014

Trần Văn Vinh, Nguyễn Đức Quang, Nguyễn Bá Cường,

Viện Nghiên cứu Da giày Việt Nam

Vũ Thị Ngọc Bích

Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford – Hà Nội

Hà Thị Thu

Viện Công Nghệ Sinh Học, Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam

Trịnh Lê Hùng

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội

SUMMARY

**RESEARCH ON IDENTIFYING OF ANAMMOX BACTERIA IN THE
BIOMASS OF ANAMMOX ENRICHMENT SYSTEM IN LEATHER AND
SHOE RESEARCH INSTITUTE, MINISTRY OF INDUSTRY AND TRADE
USING MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES**

Anammox is one of the newly found drivers known to contribute to the biogeochemical nitrogen cycle. In the marine environment, more than 50% of nitrogenous compounds are reportedly converted into nitrogen gas via the anammox pathway. Several methods have been used to detect the presence and activity of anammox bacteria in the environment, including 16S rRNA gene-based approaches or based on their lipids, functional genes, and unique reaction pathways. Here, we report a molecular method using the primer sets that were published for detecting the genes encoding 16S rRNA gene and subunit of the hydrazine oxidoreductase (hzsA) in anammox bacteria. 16S rRNA gene sequences and hzsA gene sequences were retrieved from anammox enrichment cultures system in center of analysis and environmental technology, Leather and Shoe Research Institute, Ha Noi. All sequences were demonstrated that anammox bacteria which were belonged to Candidatus Brocadia genus presented in our system.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Anammox là tên viết tắt bảy chữ cái đầu của cụm từ **Anaerobic Ammonium Oxidation**, một quá trình quan trọng trong vòng tuần hoàn Nito được thực hiện bởi các vi khuẩn [1].

Anammox là vi khuẩn tự dưỡng, chúng sử dụng CO_2 , hoặc HCO_3^- làm nguồn Carbon. Những phân tích trong hệ gen của chúng cho thấy chúng cố định CO_2 theo con đường acetyl-CoA. Năng lượng sinh ra từ con đường này được dùng để chuyển hóa nitrit và ammoni trực tiếp thành Nito. Quá trình sinh học này sinh ra Nito đã đóng góp khoảng 50% khí Nito được sinh ra từ đại dương [2-5]. Đây là điểm đặc trưng mà nhờ đó anammox đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong việc xử lý ammoni trong nước thải sinh hoạt và công nghiệp và hiện đang được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi ở các nước như Hà Lan, Nhật Bản, Đức và Trung Quốc [2, 5-8].

Vi khuẩn Anammox được xếp vào ngành Planctomycetes, lớp Planctomyces, bộ Planctomycetales, họ Planctomycetaceae với 5 chi khác nhau là *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia*, và *Scalindua*. Hầu hết chúng được tìm thấy trong quá trình xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học hoặc sống trong môi trường khoáng yếm khí. Cho tới nay người ta vẫn chưa phân lập được chúng bằng phương pháp nuôi cấy vi sinh. [6, 7, 9]

Vi khuẩn anammox sinh trưởng rất chậm, chu kỳ nhân đôi tế bào của chúng kéo dài từ 11- 20 ngày có loài còn kéo

dài hơn. Trong tự nhiên, chúng là vi khuẩn yếm khí bắt buộc và bị ức chế sinh trưởng ở nồng độ oxy 2 μM . Vì thế, cho tới nay chưa có bất kỳ bằng chứng nào về việc nuôi cấy, phân lập được các vi khuẩn anammox trong phòng thí nghiệm [6, 7]. Song có rất nhiều nghiên cứu về các đặc điểm sinh vật, hóa học của vi khuẩn anammox. Hầu hết các nghiên cứu chứng minh cấu trúc tế bào, quá trình sinh trưởng, các cơ chế quan trọng và trình tự bộ gen của chúng [7].

Năm 2005, bằng việc ứng dụng phương pháp lai phân tử có gắn huỳnh quang để xác định gen 16S của vi khuẩn anammox, Schmid và cộng sự đã xác định được các vi khuẩn anammox thuộc chi *Candidatus. Kuenenia* và *Candidatus Scalindua* trong môi trường [10]. *Candidatus* là một thuật ngữ được sử dụng trong phân loại học đối với các vi khuẩn không nuôi cấy phân lập được. Mặc dù nhóm nghiên cứu đã rất thành công trong việc thiết kế các cặp mồi đặc hiệu để xác định vi khuẩn anammox trong các môi trường khác nhau nhưng phương pháp này vẫn tồn tại những hạn chế do tính bảo tồn thấp hơn của các trình tự gen 16S trong vi khuẩn anammox. Trong một nghiên cứu khác của Penton và cộng sự năm 2006, các cặp mồi cho phản ứng lai in situ được đánh giá là đặc hiệu và nhạy hơn cũng đã được thiết kế để định danh anammox [11]. Mặc dù vậy, những cặp mồi này cũng bắt cặp cả với các gen 16S của những vi khuẩn không thuộc họ

planctomycete. Trong khi gen 16S vẫn tiếp tục được sử dụng như một marker sinh học để xác định vi khuẩn anammox thì gần đây việc xác định vi khuẩn anammox dựa vào các gen cấu trúc đặc trưng khác của chúng.

Năm 2006, nhờ vào phương pháp giải trình tự gen và phân tích trình tự của một hệ các vi khuẩn khác nhau trong một quần xã vi khuẩn được gọi là phương pháp Sequencing batch reactor (SBR) mà bộ gen của *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* một chi của vi khuẩn anammox được giải mã 74% [6, 12]. Nhờ vào kết quả này đã tạo dựng cơ sở cho việc nghiên cứu các gen chức năng khác của vi khuẩn anammox.

Dựa vào bộ gen thu được các nhà nghiên cứu đã đưa ra giả thuyết về cơ chế chuyển hóa amoni yếm khí dưới xúc tác của enzyme hydrazine oxidoreductase (hzo). Bước đầu tiên trong quá trình đó là việc khử NO_3^- thành NO_2^- dưới tác dụng của enzyme nitrite oxidoreductase, enzyme tổng hợp hydrazine sinh ra hydrazine từ NO_2^- và ammoni, cuối cùng là hydrazine được chuyển hóa thành khí nito N_2 xúc tác của enzyme hydrazine oxidoreductase (hzo). Các nghiên cứu gần đây đã đưa ra những bằng chứng một cách rất đầy đủ về cấu trúc của enzyme hzo cũng như cơ chế xúc tác của nó trong quá trình amoni yếm khí [13]. Enzyme hzo được mã hóa bởi nhóm gen hzsA, hzsB, hzsC, các gen hzo cũng được tìm thấy trong một loạt các chi vi khuẩn anammox trong các môi trường khoáng bao gồm cả các chi mới phát

hiện như *Candidatus 'Jesttenia sp'* và *Candidatus 'Kuenenia stuttgartie'* [14]. Gần đây, Schmid và cộng sự cũng đã thiết kế những cặp mồi đặc hiệu để xác định gen hzo trong sinh quyển và cho thấy hzo có mặt trong tất cả các vi khuẩn anammox được nghiên cứu, vì thế nó có thể là một tiêu chuẩn sinh học cho việc xác định vi khuẩn anammox [14, 15].

Với mục đích xác định sự có mặt của vi khuẩn anammox trong sinh khối của hệ thống làm giàu anammox bằng phương pháp tách dòng và giải trình tự gen 16S của vi khuẩn, nhân bản và giải trình tự gen hzsA (hydrazine oxidoreductase subunit A) một gen đặc trưng của vi khuẩn anammox.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Đối tượng

Sinh khối kỵ khí được lấy từ hệ thống làm giàu anammox tại Viện da giấy Việt Nam. Sinh khối gồm hai phần là phần giá thể và phần dịch nuôi cấy.

2.2 Phương pháp

Tách chiết ADN tổng số

Cắt một miếng giá thể có kích thước 1 x 1 cm, cho miếng giá thể vào ống eppendorf 1.5 ml. Cho 1 ml dịch nuôi cấy vào ống, vortex trong 30 giây. Tách riêng phần dịch và miếng giá thể.

Lấy 100 μl mẫu để tách chiết ADN tổng số bằng kit tách chiết ADN của hãng QIAGEN (Germany). ADN tổng số sau đó được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR nhân bản đoạn gen 16S của vi khuẩn và đoạn gen hzsA.

PCR nhân bản ADN

Cặp mồi được chọn lựa để nhân bản đoạn gen 16S rARN và hzsA được trình

bày trong bảng 1. Với gen 16S rARN, việc nhân bản được thực hiện bằng phản ứng PCR theo quy trình đã được mô tả trong các nghiên cứu trước đây [16]. Phản ứng PCR nhân bản gen 16S rARN bao gồm các thành phần 5 µl buffer (5X GoTaq Flexies Buffer- Promega), 3.5 µl MgCl₂ (25mM, Promega), 1µl dNTPs (10 µM, Roche), 2 µl 16S rRNA F/R (10 µM, Sigma), và H₂O trong tổng thể tích 25 µl. Chu trình nhiệt được sử dụng để nhân bản gen 16S như sau 95°C trong 2 phút, 95°C trong 30 giây, nhiệt độ gắn mỗi ở 56°C trong 30 giây, 72°C trong 1

phút 20 giây, lặp lại 30 chu kỳ từ bước 2, 72°C trong 10 phút, thực hiện trên máy PCR 9700 ABI- Mỹ.

Phản ứng nhân bản gen hzsA có trình tự cặp mỗi được mô tả ở bảng 1 và thực hiện theo những công bố trước đây [14, 15]. Nhiệt độ gắn mỗi được thực hiện ở 58°C trong 30 giây, 35 chu kỳ. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và được đọc trên máy soi gel (Gel Doc – Biorad). HzsA gen nhân bản được sử dụng làm khuôn mẫu trong phản ứng giải trình tự trực tiếp từ sản phẩm PCR.

Bảng 1:

Tên mỗi	Trình tự	Tên đoạn gen được nhân bản
16S rRNAF	5' TGC CAG CAG CCG CGG TAA 3'	16S rRNA
16S rRNAR	5' AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC 3'	16S rRNA
hzsA_526F	5'TAY TTT GAA GGD GAC TGG 3'	hzsA
hzsA_1857R	5'AAA BGG YGA ATC ATA RTG GC '3	hzsA

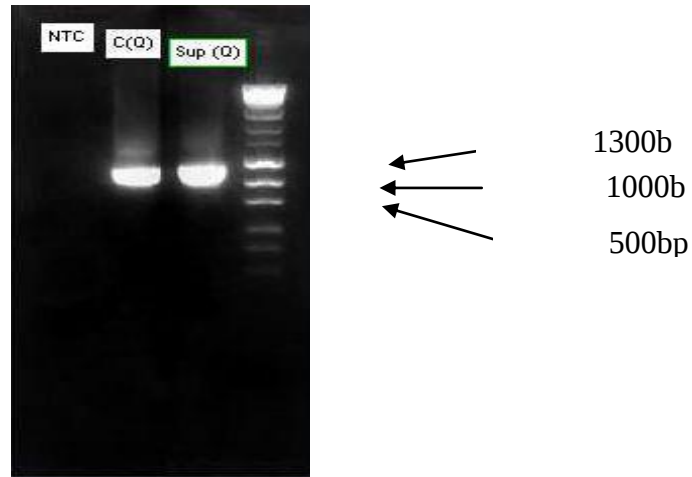
Tách dòng gen 16S rRNA nhân bản từ vi khuẩn trong sinh khối

Sản phẩm PCR 16S sau khi nhân bản và điện di trên gel, được sử dụng để gắn vào vecto pGEM-T Easy và tách dòng theo hướng dẫn của hãng Promega. Các plasmid được tách chiết và chọn lọc bằng kit Miniprep kit (QIAGEN). Các dòng vecto có AND chèn vào được kiểm tra trên gel agarose sau khi cắt bằng enzyme giới hạn EcoRI. Các plasmid sau đó được giải trình tự và phân tích bằng phần mềm DNAbaser - Heracle BioSoft S.R.L.

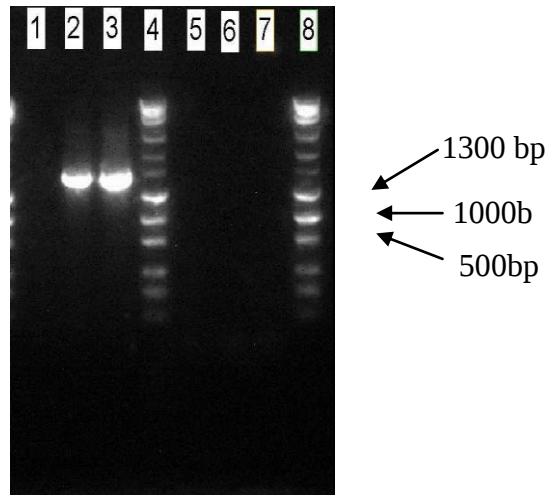
3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1 Kết quả nhân bản đoạn gen 16S rARN và đoạn gen hzsA mã hóa cho enzyme hydrazine synthase của vi khuẩn anammox

ADN từ mẫu sinh khối được tách chiết và sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Đoạn gen 16S rARN được nhân bản trong nghiên cứu này có kích thước là 850 bp. Đoạn gen hzsA đặc hiệu và có kích thước là 1331 bp. Hình 1 và hình 2 là ảnh điện di các sản phẩm nhân bản gen 16S và gen hzsA từ mẫu sinh khối từ hệ thống làm giàu anammox



Hình 1: Ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen 16S rADN từ mẫu sinh khối anammox cùng thang chuẩn. NTC: không có ADN khuôn, C(Q): ADN khuôn tách từ giá thể của sinh khối, Sup (Q): ADN khuôn tách từ dịch nuôi.



Hình 2: Điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn ADN gen *hzsA* của vi khuẩn Anammox. 1:NTC- none template control, 2: ADN khuôn tách từ dịch nuôi, 3: ADN khuôn tách từ sinh khối giá thể, 4: Maker 1 kb Fermentas, 5: ADN khuôn tách từ vi khuẩn Gram âm hiếu khí (*E.coli*), 6: ADN khuôn tách từ vi khuẩn Gram dương hiếu khí (*S.aureus*), 7: ADN khuôn tách từ nước thải sinh hoạt

3.2 Tách dòng và giải trình tự gen 16S rARN

Sản phẩm PCR của phản ứng nhân bản đoạn gen 16S rARN được gắn vào vecto

pGEM-T Easy sau đó được biến nạp vào tế bào *E.coli* Top 10. Sau quá trình chọn lọc plasmid tái tổ hợp, năm dòng khuẩn lạc có khả năng chứa plasmid tái tổ hợp

mang đoạn gen 16S rARN đã được chọn để giải trình tự gen. Phần mềm DNAbaser được sử dụng để phân tích trình tự của năm đoạn gen 16S rARN, sau đó các trình tự này được so sánh với các trình tự trong dữ liệu của ngân hàng gen thế giới GenBank - NCBI [17]. Kết quả giải trình tự cho thấy, các đoạn ADN chèn vào vecto đều là các đoạn ADN của gen 16S rARN của vi khuẩn, với tỷ lệ tương đồng là 99%. Đồng thời chúng ta có thể thấy trong sinh khối của quá trình làm giàu anammox tồn tại nhiều loại vi sinh vật kỵ khí bao gồm *Acidovorax sp*, *Chloroflexi bacterium*,

Candidatus Brocadia, *Denitratisoma sp*. *Candidatus Brocadia* là một trong năm chi của vi khuẩn anammox [6, 7, 9] (Bảng 2). Mặc dù vậy, theo nhiều nghiên cứu trước đây, gen 16S rARN không phải là một tiêu chuẩn vàng trong việc định danh vi khuẩn thuộc họ anammox do đặc điểm không phân lập được của chúng [15]. Mặt khác, trình tự gen 16S rARN thực tế chỉ chính xác được đến cấp độ chi (genus) của anammox mà chưa xác định được tên loài (species). Chính vì nhược điểm này nên chúng tôi tiến hành giải trình tự gen *hzsA* đặc trưng cho anammox.

Bảng 2: Quần thể vi sinh vật kỵ khí có mặt trong sinh khối kỵ khí lấy từ hệ thống làm giàu anammox tại Viện Da giấy Việt Nam (Kết quả so sánh trình tự gen 16S rARN với ngân hàng gen thế giới GenBank).

Dòng Plasmid	Tên loài	Tỷ lệ tương đồng	Mã trong Genbank
1	Acidovorax sp. B8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KF826888.1
2	Uncultured Chloroflexi bacterium clone MP-R77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	JN038747.1
3	Uncultured Candidatus Brocadia sp. clone KTH11-Amx-C10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KF606759.1
	Uncultured Candidatus Brocadia sp. clone KTH11-Amx-A01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KF606757.1
4	Uncultured planctomycete clone Pla_PO55-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	GQ356105.1

	Uncultured Candidatus Brocadia sp. clone KTH11-Amx-C10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KF606759.1
	Uncultured Candidatus Brocadia sp. clone KTH11-Amx-A01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	KF606757.1
5	Denitratisoma sp. enrichment culture clone ANA-RAS-29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	HM769664.

3.3 Giải trình tự gen hzsA mã hóa cho enzyme hydrazine syntheses của vi khuẩn anammox

Bigdye® Xterminator V3.1 cycle sequencing kit được sử dụng trong phản ứng giải trình gen hzsA. Kết quả giải trình tự sau đó được phân tích bằng phần mềm DNAbaser, và được so sánh với dữ liệu trong ngân hàng gen thế giới (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Trình tự đoạn gen hzsA thu được tương đồng 95% so với trình tự của hzsA từ *Candidatus Brocadia fulgida* tìm thấy tại Trung Quốc và đã được đăng ký trong GenBank với mã số đăng ký là JN703714.1[15, 18].

4. KẾT LUẬN

Đã thực hiện thành công nhân bản giải trình tự gen 16S và hzsA của vi khuẩn anammox trong mẫu sinh khối được làm giàu tại Viện Nghiên cứu Da Giầy, Bộ Công Thương.

Trình tự thu được cho thấy vi khuẩn anammox trong mẫu là chi *Candidatus*

Brocadia với độ tin cậy là 99% và là loài *Candidatus Brocadia fulgida* với độ tin cậy là 95%.

Đây là nghiên cứu nhằm định danh vi khuẩn anammox lần đầu tiên tại Việt Nam do Viện Nghiên cứu Da Giầy, Bộ Công Thương thực hiện.

5. KIẾN NGHỊ

Cần thiết những nghiên cứu sâu sắc hơn về các đặc điểm sinh trưởng phát triển và sinh học phân tử của Anammox có trong sinh khối, tạo cơ sở cho việc đưa anammox ứng dụng trong xử lý nước thải.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arrigo, K.R., *Marine microorganisms and global nutrient cycles*. Nature, (2005). **437**(7057): p. 349-55.
2. Kimura, Y., K. Isaka, and F. Kazama, *Effects of inorganic carbon limitation on anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity*. Bioresour Technol, (2011). **102**(6): p. 4390-4.
3. Lu, H., S. Ding, and P. Zheng, *[Central metabolism of anammox*

bacteria--a review]. Wei Sheng Wu Xue Bao, (2011). **51**(8): p. 1014-22.

4. Zhu, G., et al., *Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems*. Appl Microbiol Biotechnol, (2010). **86**(4): p. 1043-55.

5. van de Vossenberg, J., et al., *Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production*. Environ Microbiol, (2008). **10**(11): p. 3120-9.

6. Jetten, M.S., et al., *Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria*. Crit Rev Biochem Mol Biol, (2009). **44**(2-3): p. 65-84.

7. Kuenen, J.G., *Anammox bacteria: from discovery to application*. Nat Rev Microbiol, (2008). **6**(4): p. 320-6.

8. Kuypers, M.M., et al., *Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea*. Nature, (2003). **422**(6932): p. 608-11.

9. Sonthiphand, P. and J.D. Neufeld, *Evaluating primers for profiling anaerobic ammonia oxidizing bacteria within freshwater environments*. PLoS One, (2013). **8**(3): p. e57242.

10. Schmid, M.C., et al., *Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria*. Appl Environ Microbiol, (2005). **71**(4): p. 1677-84.

11. Penton, C.R., A.H. Devol, and J.M. Tiedje, *Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments*. Appl

Environ Microbiol, (2006). **72**(10): p. 6829-32.

12. Strous, M., et al., *Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome*. Nature, (2006). **440**(7085): p. 790-4.

13. Schmid, M.C., et al., *Environmental detection of octahem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria*. Environ Microbiol, (2008). **10**(11): p. 3140-9.

14. Li, M., et al., *A comparison of primer sets for detecting 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase genes of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine sediments*. Appl Microbiol Biotechnol, (2010). **86**(2): p. 781-90.

15. Harhangi, H.R., et al., *Hydrazine synthase, a unique phylomarker with which to study the presence and biodiversity of anammox bacteria*. Appl Environ Microbiol, (2012). **78**(3): p. 752-8.

16. Neef, A., et al., *Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes*. Microbiology, (1998). **144** (Pt 12): p. 3257-66.

17. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, (1990). **215**(3): p. 403-10.

18. Quan, Z.X., et al., *Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor*. Environ Microbiol, (2008). **10**(11): p. 3130-9.