

QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH NITROGEN TRONG RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ VÀ CÁC VI SINH VẬT THAM GIA

Đinh Thúy Hằng¹, Trần Triết²

¹Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trầm tích trong rừng ngập mặn thường bị hạn chế về nitrogen và phosphorus. Nitrogen ở dạng khí hòa tan là nguồn dự trữ lớn tại vùng sinh thái này, do vậy các vi sinh vật cố định nitrogen có vai trò vô cùng quan trọng ở đây. Tại rừng ngập mặn Cần Giờ, chúng tôi đã xác định được hàm lượng nitrogen tổng số cao nhất ở 2 - 3 cm bề mặt trầm tích (342 nmol.kg^{-1}) và giảm dần theo độ sâu, thể hiện sự đóng góp của nitrogen rửa trôi từ đất liền đối với trầm tích bề mặt và vai trò của vi sinh vật cố định nitrogen bản địa trong việc duy trì nguồn nitrogen ở lớp trầm tích dưới bề mặt. Thông qua phương pháp khử acetylene, nitrogenase được xác định hầu như không có hoạt tính ở trầm tích bề mặt mà tập trung chủ yếu ở độ sâu dưới 5 cm, là nơi có môi trường thiếu oxygen. Phân tích thư viện gen *nifH* mã hóa cho dinitrogenase reductase của phức hợp nitrogenase cho phép xác định mức độ đa dạng cao của vi sinh vật cố định nitrogen ở cả lớp trầm tích bề mặt và lớp trầm tích sâu dưới 5 cm, trong đó các nhóm vi khuẩn kỵ khí như *Desulfovibrio* hay *Geobacter* chiếm ưu thế. Điều này cho thấy, sự khác biệt rõ rệt của quần thể vi sinh vật cố định nitrogen ở rừng ngập mặn so với các vùng rễ lúa hay các cây họ đậu, nơi có các loài hiếu khí (*Rhizobium*, *Agrobacter* ...) chiếm ưu thế.

Từ khóa: Cố định nitrogen, nitrogenase, *nifH*, rừng ngập mặn, trầm tích, vi khuẩn kỵ khí

MỞ ĐẦU

Rừng ngập mặn là vùng sinh thái có mức sinh trưởng cao và đa dạng sinh học phong phú. Loại hình sinh thái này khu trú dọc theo các bờ biển vùng nhiệt đới, chiếm 60 - 70% diện tích bờ biển trên trái đất (Clough, 1998). Nằm ở vị trí trung gian giữa biển và đất liền, rừng ngập mặn có vai trò như hệ thống lọc đối với các nguồn nước từ đất liền ra biển, do vậy có ảnh hưởng lớn đến đặc điểm sinh thái tại các vùng biển gần bờ (Ditmar, Lara, 2000; Tam, Wong, 2000).

Với điều kiện thường xuyên ngập nước, môi trường cho vi sinh vật phát triển trong lớp trầm tích ở rừng ngập mặn chủ yếu là kỵ khí (Ditmar, Lara, 2001). Lớp trầm tích của rừng ngập mặn nói chung được đặc trưng bởi môi trường nước lợ và có hàm lượng carbon hữu cơ cao nhưng lại bị hạn chế về nitrogen và phosphorus (Ditmar, Lara, 2000). Ngoài một phần nitrogen được đem tới từ đất liền, nguồn nitrogen chính để đảm bảo cân bằng trong chu trình tuần hoàn vật chất ở rừng ngập mặn do nhóm vi khuẩn cố định nitrogen đảm nhiệm, chuyển hóa nitrogen khí quyển (N_2) thành ammonium (Cleveland, 1999; Ditmar, Lara, 2000).

Nitrogenase là một phức hợp enzyme có chức năng xúc tác cho các phản ứng trong quá trình cố

định nitrogen gồm hai protein khác nhau: protein chứa sắt (dinitrogenase reductase) và protein chứa molipden (dinitrogenase). *nifH* là gen mã hóa cho protein chứa sắt, có độ bảo thủ cao trong các loài vi sinh vật khác nhau, do vậy thường được dùng làm công cụ để nghiên cứu vi sinh vật cố định nitrogen trong môi trường tự nhiên (Zehr, Capone, 1996). Cây phả hệ dựa trên trình tự gen *nifH* thường thể hiện chính xác mối tương quan giữa các loài như ở cây phả hệ dựa trên trình tự 16S rDNA (Hennecker *et al*, 1985).

Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành tìm hiểu quá trình cố định nitrogen diễn ra trong lớp trầm tích của rừng ngập mặn tại các độ sâu khác nhau, cũng như xác định các nhóm vi khuẩn đóng vai trò chủ đạo trong quá trình này thông qua nghiên cứu gen *nifH* bằng phương pháp thiết lập và phân tích thư viện gen.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu mẫu trầm tích theo chiều sâu

Mẫu trầm tích được thu thập bằng dụng cụ hình ống (Hình 1), đảm bảo mẫu ở các tầng khác nhau

không bị xáo trộn. Mẫu sau khi thu được cắt lớp theo độ sâu khác nhau 5, 10, 15 và 20 cm và bảo quản trong 4°C cho đến khi tiến hành phân tích trong phòng thí nghiệm.

Định lượng hoạt tính cố định nitrogen sinh học trong mẫu trầm tích

Hoạt tính cố định nitrogen được xác định theo phương pháp của Hardy và đồng tác giả (1973), trong đó acetylene được dùng làm cơ chất cho enzyme nitrogenase và hoạt tính được xác định thông qua lượng ethylene tạo ra trên máy sắc ký khí Shimadzu 1500, sử dụng helium là khí mang và đầu đọc TCD.

Xác định hàm lượng nitrogen tổng số trong mẫu trầm tích

Mẫu trầm tích được sấy khô và tán nhỏ trước khi tiến hành xác định hàm lượng nitrogen tổng số trên máy phân tích nguyên tố hóa học (Euro-EA Elemental Analysis) theo nguyên lý đốt cháy kết hợp với sắc ký khí.

Tách chiết DNA tổng số từ mẫu trầm tích

DNA tổng số trong mẫu trầm tích được tách chiết theo phương pháp do Zhou và đồng tác giả (1996) mô tả với cải biến ở nồng độ proteinase K là 20 mg/ml và nồng độ đệm phosphate trong dung dịch phá tế bào là 120 mM.

Thiết lập và phân tích thư viện gen nitrogenase

Đoạn gen *nifH* dài 400 bp được khuếch đại với mẫu DNA tổng số tách chiết trực tiếp từ mẫu trầm tích sử dụng cặp mồi có độ biến tính cao: mồi xuôi 5'- GGHAARGGHGGHATHGGNAARTC -3' và mồi ngược 5'- GGCATNGCRAANCCVCCRCAN AC -3 (Mehta *et al.*, 2003). Sản phẩm PCR sau đó được gắn vào pCR4-TOPO vector sử dụng TOPO TA cloning Kit và tế bào khả biến One Shot TOP10 theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen). Các dòng được chọn một cách ngẫu nhiên để thiết lập thư viện gen. Đoạn chèn của gen *nifH* sau đó được khuếch đại sử dụng cặp mồi M13 xuôi và ngược, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QiaQuick PCR purification Kit (QiaGen) và đọc trình tự theo cả hai chiều bằng các đoạn mồi T3 và T7. Các trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm BioEdit, dịch sang trình tự amino acid và so sánh về độ tương đồng với các trình tự đã công bố trên GenBank sử dụng công cụ BLAST.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm các mẫu trầm tích nghiên cứu

Trầm tích trong rừng ngập mặn được chia thành hai vùng khác nhau, vùng bờ nước và vùng rễ. Bùn trầm tích ở vùng bờ nước có màu sáng và thường xuyên tiếp xúc với ánh sáng mặt trời, trong khi đó bùn ở vùng rễ được có màu tối đến đen và hầu như bị che phủ hoàn toàn, không có ánh sáng mặt trời rơi vào (Hình 1A, B). Ở mỗi vùng, mẫu được thu bằng dụng cụ hình ống (Hình 1C) với độ lặp lại là 3, sau đó phân tầng 5, 10, 15, 20 cm chuyển vào các ống có nút xoáy, bảo quản tại 4°C cho đến khi tiến hành phân tích trong phòng thí nghiệm.

Hàm lượng nitrogen tổng số trong mẫu bùn trầm tích

Lượng nitrogen tổng số trong mẫu bùn trầm tích được xác định đối với các tầng khác nhau (Hình 2) cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa mẫu ở vùng bờ nước và mẫu ở vùng rễ được. Ở cả hai vùng này, nồng độ nitrogen cao nhất ở khoảng 2 - 3 cm bề mặt và giảm dần theo độ sâu. Hiện tượng này có thể được giải thích do tầng bề mặt được bổ sung một lượng đáng kể nitrogen từ nguồn nước trong đất liền chảy ra. So với lượng carbon có mặt trong môi trường sinh thái này (khoảng 2000 mmol/kg bùn) thì lượng nitrogen chưa đạt mức độ tối ưu cho các quá trình chuyển hóa sinh học tại đây, hay nói cách khác môi trường rừng ngập mặn ở trạng thái thiếu nitrogen. Hiện tượng này cũng được công bố trong các nghiên cứu trước đây (Ditmar, Lara, 2000).

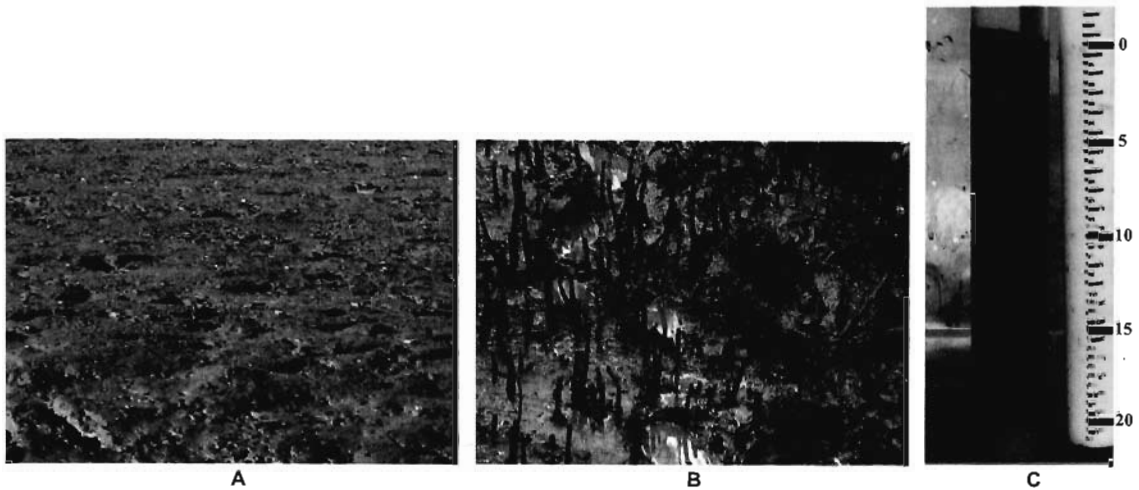
Hoạt tính nitrogenase trong mẫu bùn trầm tích

Mức độ tham gia của vi sinh vật trong việc cung cấp nguồn nitrogen cho hệ sinh thái tại rừng ngập mặn được xác định thông qua hoạt tính nitrogenase, là enzyme chỉ có ở vi sinh vật, thực hiện phản ứng khử phân tử N_2 thành NH_4 . Kết quả thí nghiệm đo hoạt tính khử acetylene cho thấy enzyme này hầu như không thể hiện hoạt tính ở 5 cm bề mặt của các mẫu bùn, như vậy nguồn nitrogen ở đây được cung cấp chủ yếu từ đất liền. Khác với bề mặt, bùn ở độ sâu dưới 5 cm có hoạt tính enzyme khá cao, đạt 40 - 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ bùn (Hình 3), chứng tỏ nguồn nitrogen ở đây được duy trì một phần đáng kể do vi sinh vật cố định nitrogen bản địa.

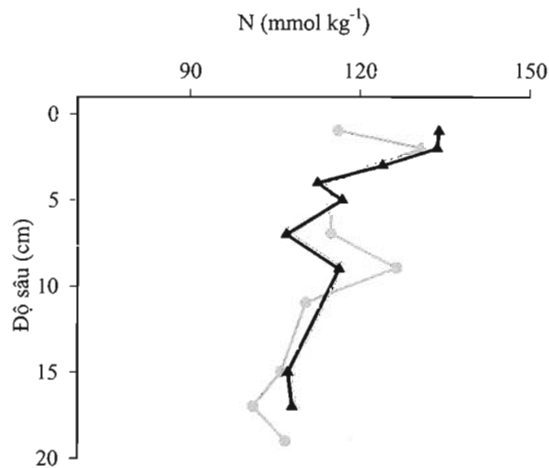
Có thể nhận thấy rằng hoạt tính nitrogenase ở vùng bờ nước (vùng được chiếu sáng) và vùng rễ được (vùng không được chiếu sáng) không có sự

khác biệt đáng kể, như vậy vai trò của các loài cố định nitrogen quang dưỡng ở đây (*Cyanobacteria*,

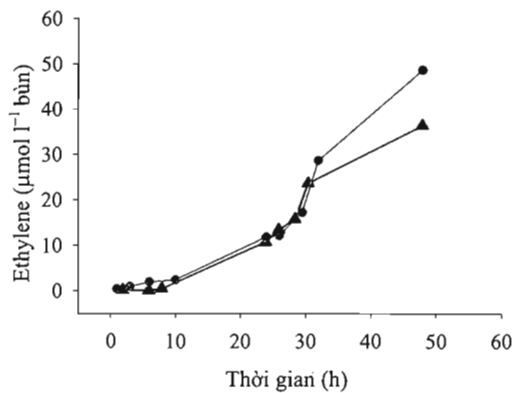
Rhodobacter...) không quan trọng so với các loài hóa dưỡng.



Hình 1. Mẫu bùn trầm tích thuộc vùng bờ nước (A) và vùng rễ đước (B) được thu theo chiều sâu bằng dụng cụ ống (C), đảm bảo bùn ở các tầng khác nhau không bị xáo trộn.



Hình 2. Hàm lượng nitrogen tổng số trong mẫu bùn trầm tích ở rừng ngập mặn tại vùng bờ nước (○) và vùng rễ đước (▲).



Hình 3. Hoạt tính enzyme nitrogenase trong các mẫu bùn ở vùng bờ nước (○) và vùng rễ đước (▲) tại độ sâu 5 - 15 cm.

Đa dạng vi sinh vật tham gia quá trình cố định nitrogen thể hiện qua phân tích thư viện gen *nifH*

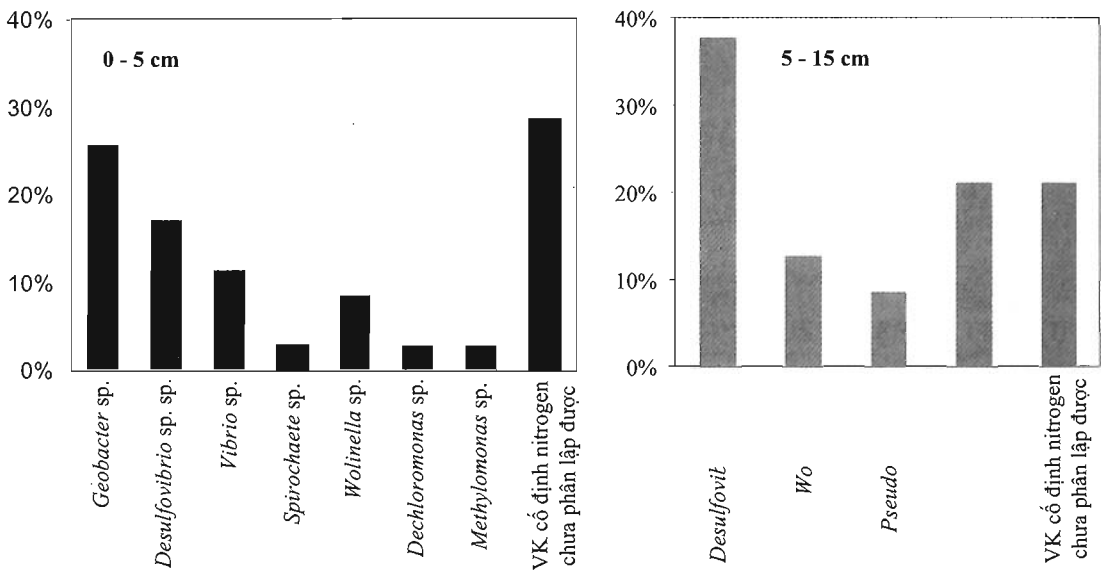
Trong nghiên cứu này, đoạn 400 bp của gen *nifH* được khuếch đại với mỗi đặc hiệu và tách dòng sử

dụng vector pCR4 (Invitrogen) để thiết lập thư viện gen. Hai thư viện gen với độ lớn 60 đơn vị tách dòng (clone) trong mỗi thư viện đã được thiết lập cho mẫu bùn bề mặt (0 - 5 cm) và mẫu bùn sâu (5 - 15 cm). Kết quả phân tích trình tự các clone và so sánh với

ngân hàng dữ liệu trình tự amino acid của GeneBank cho thấy mức độ đa dạng cao của vi sinh vật cố định nitrogen ở cả hai mẫu (Hình 4).

So với mẫu ở độ sâu dưới 5 cm, mẫu bề mặt có quần thể vi sinh vật mang gen mã hóa cho nitrogenase đa dạng hơn. Tuy nhiên, trong cả hai độ sâu, bên cạnh nhóm vi khuẩn chưa phân lập được, nhóm vi khuẩn sinh trưởng kỵ khí như *Desulfovibrio* hay *Geobacter* chiếm tỷ lệ lớn hơn cả. Điều này cũng phản ánh môi trường thiếu oxygen trong bùn ở rừng ngập mặn và ưu thế của các loài kỵ khí. Các nghiên cứu trước đây cho thấy nhiều loài vi khuẩn khử sulfate thuộc chi *Desulfovibrio* mang gen

nitrogenase và có khả năng cố định nitrogen (Rabus, Widdel, 2000). Khác với vi khuẩn khử sulfate, vi khuẩn khử sắt III *Geobacter* chưa được kiểm chứng về khả năng cố định nitrogen, tuy nhiên nhóm vi khuẩn này là một nhóm kỵ khí quan trọng trong một số vùng sinh thái, trong đó có rừng ngập mặn (Bazylinski *et al.*, 2000). Trong cả hai loại mẫu được phân tích, nhóm vi khuẩn khử sulfate thuộc chi *Desulfovibrio* đều có mặt với tỷ lệ cao (27% trong mẫu 5 cm bề mặt và 38% trong mẫu dưới 5 cm). Kết quả này cũng phù hợp với mật độ vi khuẩn khử sulfate cao trong rừng ngập mặn do nồng độ sulfate được đưa vào từ nước biển (Ditmar, Lara, 2001).



Hình 4. Đa dạng vi khuẩn cố định nitrogen trong mẫu bùn tại rừng ngập mặn Cần Giờ theo phương pháp phân tích thư viện gen *nifH*.

KẾT LUẬN

Nitrogen tổng số trong mẫu bùn ở rừng ngập mặn Cần Giờ cao nhất ở 5 cm bề mặt và giảm dần theo độ sâu. Lượng nitrogen này chưa đạt mức độ tối ưu cho các quá trình chuyển hóa sinh học tại đây. Hoạt tính nitrogenase được xác định ở mức cao nhất trong mẫu bùn ở độ sâu dưới 5 cm, trong khi đó mẫu bề mặt hầu như không có hoạt tính này, chứng tỏ vai

trò ưu thế của các nhóm vi sinh vật kỵ khí trong quá trình cố định nitrogen ở môi trường sinh thái rừng ngập mặn. Kết quả phân tích thư viện gen *nifH* cho thấy các nhóm vi khuẩn kỵ khí (*Desulfovibrio* và *Geobacter*) đóng vai trò quan trọng trong quá trình cố định nitrogen tại rừng ngập mặn. Bên cạnh đó, một lượng lớn vi khuẩn tham gia quá trình này thuộc nhóm chưa phân lập được (chiếm trên 20% tổng số clone trong cả hai mẫu đã phân tích).

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn cán bộ Bộ môn Sinh thái Môi trường, khoa Sinh học - Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh đã giúp đỡ trong việc thu mẫu tại rừng phòng hộ Cần Giờ, thành phố Hồ Chí Minh. Nghiên cứu được thực hiện với sự trợ giúp của Đề tài Khoa học Cơ bản 621506.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bazylinski DA, Dean AJ, Schueler D, Phillips EJP, Lovley DR (2000) N_2 -dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. *Environ Microbiol* 2: 266-273.
- Cleveland CC (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N_2) fixation. *Glob. Biogeochem Cycles* 13: 623-645.
- Clough B (1998) Mangrove forest productivity and biomass accumulation in Hinchinbrook Channel, Australia. *Mangroves. Salt Marshes* 2: 191-198.
- Dittmar T, Lara RJ (2000) Driving forces behind nutrient and organic matter dynamics in a mangrove tidal creek in north Brazil. *Estuar Coast Shelf Sci* 52: 249-259.
- Dittmar T, Lara RJ (2001) Molecular evidence for lignin degradation in sulfate-reducing mangrove sediments (Amazonia, Brazil). *Geochim Cosmochim Acta* 65: 1417-1428.
- Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD (1973) Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Biochem* 5: 47-81.
- Hennecke H, Kaluza K, Thony B, Fuhrmann M, Ludwig W, Stackebrandt E (1985) Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch Microbiol* 142: 342-348.
- Mehta MP, Butterfield DA, Baross JA (2003) Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Appl Environ Microbiol* 69: 960-970.
- Rabus R, Widdel F (2000) *Dissimilatory sulfate and sulfur-reducing prokaryotes*. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt eds, *The Prokaryotes: an Evolving electronic resource for the microbiological community*. Springer-Verlag, New York.
- Tam NFY, Wong YS (2000) Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps. *Environ Pollut* 110: 195-205.
- Zehr JP, Capone DG (1996) Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. *Microb Ecol* 32: 263-281.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316-322.

NITROGEN FIXATION IN CAN GIO MANGROVE AND THE INVOLVING MICROORGANISMS

Dinh Thuy Hang^{1,*}, Tran Triet²

¹Institute of Microbiology and Biotechnology, National University Hanoi

²University of Natural Sciences, National University HCM City

SUMMARY

Mangrove sediments are usually limited in nitrogen and phosphorus. Dissolved nitrogen, the largest nitrogen reservoir would help to solve this problem through activity of nitrogen-fixing microorganisms, the role of these microbes is therefore quite important in mangrove ecosystem. In Cangio mangrove, the total nitrogen content was measured highest at 2 - 3 cm surface of the sediment (342 nmol.kg^{-1}) and gradually decreased with depth, indicating the contribution of nitrogen washed out from land to the surface layers and the role of native nitrogen fixing microbes in supplying nitrogen for deeper layers. By using acetylene reduction assay, the enzyme nitrogenase was determined with minor activity in the surface layers, but with high activity concentrated at the depth below 5 cm, where oxygen is limited. Analyses of clone library of the *nifH* gene, coding for dinitrogenase reductase of the nitrogenase complex showed highly diversified nitrogen-fixing communities in both surface and deep sediments, among those anaerobic species such as *Desulfovibrio* and

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37547694; Fax: 84-4-37547407; E-mail: dthang@vnu.edu.vn

Geobacter were most abundant. This finding revealed a significant distinction between nitrogen-fixing community in mangroves and that in rice or bean rhizosphere, where aerobic species (*Rhizobium*, *Agrobacter* ...) are dominant.

Keywords: *Anaerobic bacteria, mangrove, nifH, nitrogenase, nitrogen fixation, sediment*