

PHÂN LẬP VI KHUẨN *PSEUDOMONAS STUTZERI* TRONG ĐẤT ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Cao Ngọc Diệp, Phan Trường Khanh, Nguyễn Thị Xuân Mỹ

Viện Nghiên cứu và Phát triển sinh học, Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Hai mươi chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* được phân lập từ ba vùng đất khác nhau ở Đồng bằng sông Cửu Long theo tiêu chuẩn đã công bố trước đây, trong đó 12 chủng vi khuẩn được xác định bằng 16S rRNA với cặp mồi chung trên thang chuẩn (ladder 1,5 kb) cùng với đôi chứng dương (chủng ATCC 14405) và chỉ có 1 chủng (P8) được xác định bằng cặp mồi đặc trưng ở thang 445 bp, chủng này được giải trình tự và bộ gen của nó được tìm trong GenBank và xác định chính xác (99%) là vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* với phần mềm BLASTN.

Từ khóa: Đồng bằng sông Cửu Long, khử đạm, nitrite hóa, ô nhiễm ammonia, *Pseudomonas stutzeri*

MỞ ĐẦU

Nguồn lợi thu từ xuất khẩu thủy sản (tôm, cá) quá cao nên nhiều nông dân chuyển đổi vùng trồng lúa bắp bệnh sang đào ao nuôi tôm sú, cá tra; từ nguồn thức ăn dư thừa và phân thải của hai loài thủy sản này dẫn đến sự phát triển của vi khuẩn kỵ khí ở tầng đáy ao, dẫn đến nguồn nước nuôi thủy sản bị ô nhiễm, chủ yếu là ammonia và hydrogen sulfur do nhóm vi khuẩn kỵ khí sinh ra. Ammonia là một độc tố trong nước (Arthur *et al.*, 1987) và ammonia cũng có thể bị loại ra khỏi nước bằng cách cung cấp một lượng oxygen liên tục hay thông qua quá trình nitrite hóa và phản nitrite hoá, trong đó NH_3 chuyển sang NO_2 , NO_3 , NO , N_2O và N_2 bay vào không khí. *Pseudomonas stutzeri* là một loài vi khuẩn có mặt nhiều nơi trên trái đất, nó có khả năng thúc đẩy quá trình nitrite hóa và khử đạm (Zumft, 1992), đặc biệt nó có mặt ở những nơi có nhiều nitrogen như nguồn nước bị nhiễm ammonia từ ao cá, tôm và trại chăn nuôi (Lee *et al.*, 2002). Mục tiêu của đề tài là phân lập, nhận diện *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp sinh học phân tử, tiến tới sản xuất chế phẩm sinh học để xử lý nước thải bị nhiễm ammonia.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu đất

Đất được thu ở những vùng trồng lúa cao sản, nuôi tôm, tràm ở Chợ Mới (tỉnh An Giang); Vĩnh Lợi, Vĩnh Châu (tỉnh Bạc Liêu); Ô Môn (thành phố Cần Thơ); Tam Nông (tỉnh Đồng Tháp); Thạnh Hóa

(tỉnh Long An), ở Đồng bằng sông Cửu Long bốn nhiều phần nitrogen hóa học.

Môi trường SW-LB (Sea water LB) (Sikorski *et al.*, 2002)

10 g peptone, 5 g yeast extract, 24 g NaCl, 10,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g NaHCO_3 trong 1 l nước.

Cặp mồi chung (universal primers) và cặp mồi đặc hiệu (specific primers) (Bennasar *et al.*, 1998)

Cặp mồi chung (universal primers) F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3'); R (5'- CGG TTA CCT TGT TAG GAC TTC ACC -3').

Cặp mồi đặc hiệu (specific primers) F (5'- AGT CAC ACT GGA ACT GAG ACA -3'); R (5'- TGT CAG TAT TAG CCC AGG TG -3').

Cách thực hiện

Đất được pha loãng 10 lần với nước cất tiệt trùng và lắc trên máy lắc ngang trong 2 h để cho vi khuẩn giải phóng ra khỏi đất vào trong nước; 0,1 ml dịch pha loãng từ đất được trải trên bề mặt môi trường SW-LB [SW, sea water] đặc bổ sung 10 mM NH_4Cl và 10 mM KNO_3 (Sikorski *et al.*, 2002), để trong buồng cấy vô trùng cho khô tự nhiên và đem ủ ở 30°C. Sau 2 hay 3 ngày, các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường SW-LB đặc, cấy truyền nhiều lần trên các đĩa petri chứa môi trường SW-LB mới cho đến rỗng và xem như là một chủng. Các chủng này được nuôi trên môi trường SW-MS (tinh bột) và SW-ME (ethylene glycol) (Sikorski *et al.*, 2002), nếu như

các chủng vi khuẩn đều phát triển trên môi trường trên thì được xem như là các chủng *Pseudomonas stutzeri*, vì vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* phát triển tốt trên môi trường với nguồn carbon là tinh bột và ethylene glycol trước khi được nhận diện bằng phương pháp sinh học phân tử, cuối cùng các chủng này được cấy trên môi trường SW-LB, trừ ở -20°C . DNA của các chủng vi khuẩn được trích ly và tinh sạch theo phương pháp của Hallin và Lindgren (1999); khuếch đại đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi chung, tiếp đến khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu sau đó chủng vi khuẩn nào cho băng 445 bp trên điện di đồ theo thang chuẩn 100 bp sẽ được giải trình tự với 1 trong 2 cặp mồi đặc trưng trên máy giải trình tự Hitachi, đoạn gen giải mã được so sánh với các trình tự gen 16S rDNA khác của vi khuẩn trên GenBank, sử dụng phần mềm BLASTN để xác định chính xác danh tính của chủng vi khuẩn này.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đã phân lập được 20 chủng vi khuẩn, các chủng vi khuẩn này đều có độ nổi khuẩn lạc mờ hay trơn, màu trắng sữa hay vàng nhạt (Hình 1).



Hình 1. Khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* trên môi trường SW-LB.

Vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, có hình dạng que, có kích thước trung bình chiều dài 1,0 - 2,5 μm và chiều ngang từ 0,4 - 0,9 μm (Bảng 1).

Gen 16S rRNA của 12 chủng vi khuẩn đã được khuếch đại với cặp mồi chung trong tổng số 20 chủng vi khuẩn phân lập ở thang chuẩn 1,5 kb (Hình 2) rải rác trong 3 vùng sinh thái đất mặn (Bạc Liêu), đất phèn (Đồng Tháp, Long An), đất phù sa (An

Giang và Cần Thơ).

Trong số 12 chủng vi khuẩn phân lập cho băng 1,5 kb trên điện di đồ chỉ có 1 chủng [P8] được nhận diện chính xác bằng phương pháp PCR 16S rRNA với cặp mồi đặc trưng của vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* (Hình 3) cùng băng với đối chứng dương (ATCC 14405).

Sản phẩm PCR của chủng này được giải trình tự trên máy giải trình tự Hitachi cho đoạn gen gồm 768 base nitrogen và đoạn gen này đã được so sánh với các gen 16S rRNA vi khuẩn trên GenBank với phần mềm BLASTN, kết quả nhận được cho thấy đoạn gen 16S rRNA của P8 có độ tương đồng đến 99% so với trình tự gen 16S rRNA của *Pseudomonas stutzeri* với số đăng kí trên ngân hàng gen Quốc tế là EM_PRO:Y18006 (Hình 4).

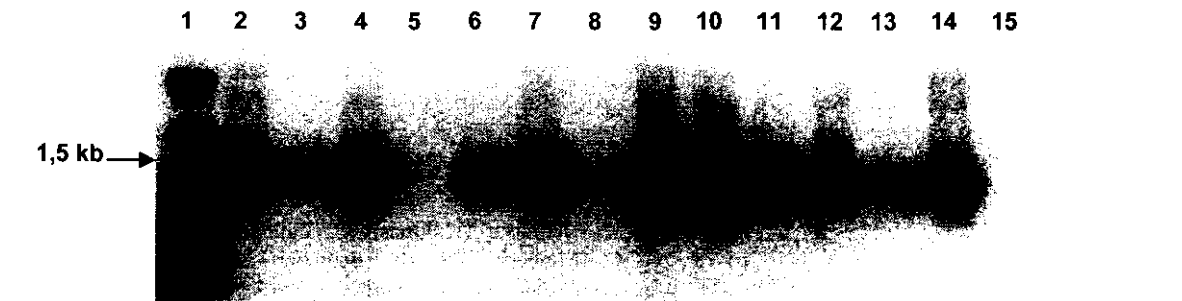
Chi *Pseudomonas* là một trong những chi đa dạng và có ý nghĩa sinh thái nhất trên trái đất (Spiers *et al.*, 2000), và giữ vai trò quan trọng trong chu trình carbon và nitrogen (Cladera *et al.*, 2004). *Pseudomonas stutzeri* là loài có ý nghĩa nhất trong chi này bởi vì chúng có thể biến dưỡng nhiều nguồn carbon khác nhau, đặc biệt chúng có thể khoáng hóa nhiều chất ô nhiễm nguồn gốc hữu cơ và vô cơ trong điều kiện hiếu khí lẫn kỵ khí, và chúng xuất hiện trong nhiều môi trường khác nhau (ô nhiễm dầu thô, bệnh viện) (Bennarsar *et al.*, 1998; Sikorski *et al.*, 2002). Nhiều chủng *Pseudomonas stutzeri* có khả năng phân hủy được các dung môi hữu cơ (Garcia-Valdes *et al.*, 1988) hay polyethylene glycols (Obradors, Aguillar, 1991), đặc biệt loài vi khuẩn này có khả năng loại bỏ nitrogen trong môi trường nước rất tốt vì chúng có đủ các gen *nir*, *nos*, *nor*, nhất là oxy hóa ammonia rất nhanh (Zumft, 1997). Vì vậy, việc phân lập, xác định chính xác loài này bằng phương pháp sinh học phân tử (kỹ thuật PCR, giải trình tự) rất cần thiết để tiến tới chọn lọc các chủng tốt phục vụ trong công tác xử lý môi trường ô nhiễm nitrogen và các chất ô nhiễm khác.

KẾT LUẬN

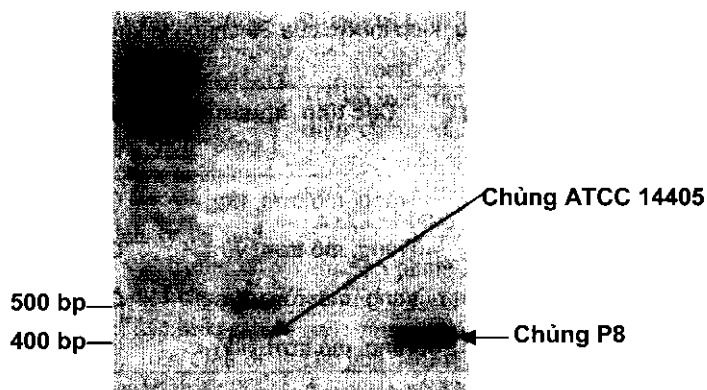
Phân lập được 20 chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* trong ba vùng sinh thái khác nhau ở Đồng bằng sông Cửu Long theo quy trình Sikorski và đồng tác giả (2002), xác định 12 chủng vi khuẩn này bằng kỹ thuật PCR-16S rRNA với cặp mồi chung và cặp mồi đặc trưng (Bennasar *et al.*, 1998) giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng P8 và định danh chính xác đến loài *Pseudomonas stutzeri*.

Bảng 1. Đặc tính khuẩn lạc và hình dạng, kích thước của 20 chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri*.

Địa điểm	Tên chủng	Đặc tính khuẩn lạc	Hình dạng	Kích thước tế bào (µm)
Quận Ô Môn, thành phố Cần Thơ	P1	Trắng, mô trơn, lớn	Que dài	0,7 - 2,3
	P2	Trắng, mô trơn, vừa	Que	0,5 - 1,6
	P3	Vàng, mô trơn, vừa	Que	0,7 - 1,5
	P4	Vàng, mô trơn, nhỏ	Que ngắn	0,4 - 1,2
Huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang	P5	Trắng đục, mô trơn, lớn	Que	0,7 - 2,1
	P6	Trắng đục, mô trơn, vừa	Que	0,5 - 1,8
	P7	Trắng đục, mô trơn, nhỏ	Que ngắn	0,4 - 1,1
	P8	Trắng sữa, mô trơn, lớn	Que dài	0,6 - 2,5
	P9	Trắng sữa, mô trơn, vừa	Que	0,5 - 1,5
	P10	Trắng sữa, mô trơn, nhỏ	Que	0,4 - 1,2
Huyện Vĩnh Lợi, tỉnh Bạc Liêu	P11	Trắng, mô trơn, lớn	Que	0,6 - 1,8
	P12	Trắng, mô trơn, vừa	Que	0,7 - 1,8
Huyện Vĩnh Châu, tỉnh Bạc Liêu	P13	Trắng, mô trơn, nhỏ	Que ngắn	0,4 - 1,0
	P14	Trắng, mô trơn, lớn	Que dài	0,7 - 2,5
	P15	Trắng sữa, mô trơn, vừa	Que	0,6 - 1,5
Huyện Tam Nông, tỉnh Đồng Tháp	P16	Vàng, mô trơn, nhỏ	Que ngắn	0,5 - 1,2
	P17	Trắng, mô trơn, lớn	Que dài	0,7 - 2,4
Huyện Thạnh Hóa, tỉnh Long An	P18	Trắng sữa, mô trơn, lớn	Que dài	0,9 - 2,5
	P19	Trắng sữa, mô trơn, nhỏ	Que ngắn	0,5 - 1,3
	P20	Trắng, mô trơn, vừa	Que	0,7 - 1,7



Hình 2. Mười hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* được xác định bằng 16S rRNA với cặp mồi chung trong thang 1,5 kb. 1: thang chuẩn 3,0 kb, 2: đối chứng dương [dòng ATCC 14405], 3: P11, 4: P13, 5: P15, 6: P16, 7: P19, 8: P20, 9: P1, 10: P3, 11: P8, 12: P5, 13: P6, 14: P9, 15: đối chứng âm.



Hình 3. Chủng vi khuẩn P8 được nhận diện ở thang chuẩn 445 bp cùng với đối chứng dương (dòng ATCC 14405).

CCCCCTCGGAGCGCAGTGGGGATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTT
CGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGC
ACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCG
TAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGATCCAAAAC TGCGGAGCTAGAGTATGG
CAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACCACTG
GGCAAATACTGACAAAAC TCTAGCTGGTGATTTTTGGATTTGTTCCAGGTTGAGCCCCGGGCTTTTTCTGTTGGGCTGAA
GAACCACCTACGCGCGCTTTGTCCCAGTAATCCGATTAAC TCTGCACCCCTTCGTATTACCGCGGGTCTTGGCACGAAG
TTAGCCGGTGCTTATTCTGTTGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAAC TTA CTGCCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTT
TACAATCCCGAAGACCTTCTTCTCACACGCGGCATGGGTGGATCAGGCTATCGCCCATTGTCCAATATTTCCCAACTGCT
GCCTCCCATAGAGTCTTGGACGTGTCTCAGTTCCCCGTGTAAACCTAA

Alignment	DB:ID	Source	Length	Score	Identify%
1 ☐	EM_PRO:Y18006	Pseudomonas stutzeri 16S rRNA gene	1480	790	99
2 ☐	EM_PRO:XB6622	Pseudomonas sp. 16S rRNA gene (partial), strain 1F-16	1402	790	99
3 ☐	EM_PRO:U26262	Pseudomonas stutzeri CCUG 11256 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.	1456	790	99

Hình 4. So sánh trình tự gen 16S rRNA của P8 và của chủng *Pseudomonas stutzeri* với số đăng ký EM_PRO:Y18006

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ Đề tài cấp Bộ Trọng điểm của Bộ Giáo Dục và Đào Tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arthur JW, West CW, Allen KN, Hedke SF (1987) Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine

invertebrate species. *Bull Environm Caontam Toxicol* 38: 324-331.

Bennasar A, Guasp C, Lalucat J (1998) Molecular Methods for the detection and identification of *Pseudomonas stutzeri* in pure culture and environmental samples. *Microb Ecol* 35: 22-33.

Cladera AM, Bennasar A, Barcelo M, Lalucat J Garcia-Valdes E (2004) Comparative genetic diversity of

Pseudomonas stutzeri genomovars, clonal structure and phylogeny of the species. *Appl Environ Microbiol* 186: 5239-5248.

Garcia-Valdes E, Cozar E, Rotger R, Lalucat J Ursing J (1988) New naththalene-degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 54: 2478-2485.

Hallin S, Lindgren P (1999) PCR Detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65: 1652-1657.

Lee H, Lee S, Lee J, Park J, Choi E, Park YK (2002) Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 85-94.

Obradors N, Aguillar J (1991) Efficient biodegradation of high-molecular-weight polyethylene glycols by pure

cultures of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol* 57: 2383-2388.

Sikorski J, Mohle M, Waskernagel W (2002) Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* population from marine sediments and soil. *Environ Microbiol* 4: 465-476.

Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146: 2345-2350.

Zumft G (1992) The denitrifying prokaryotes. In *The Prokaryotes* ed. Balows A, Truper HQ, Dwonkin M, Harder W, Schleifer KH. Berlin: Springer-Verlag: 554-582.

Zumft G (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 533-536.

ISOLATION *PSEUDOMONAS STUTZERI* FROM SOILS OF THE MEKONG DELTA, VIETNAM

Cao Ngoc Diep*, Phan Truong Khanh, Nguyen Thi Xuan My

Biotechnology Research & Development Institute, Cantho University

SUMMARY

Twenty isolate of *Pseudomonas stutzeri* were isolated from three kinds of soil in the Mekong Delta based on the protocol have been previously reported and twelve isolates were identified by 16S rRNA technique with universal primers (1.5 kb ladder) together with positive strain (ATCC 14405). One isolate (P8 isolate) was identified with specific primer at 445 bp ladder. The partial 16S rDNA gene of this isolate was sequenced and compared with bacterial 16S rDNA genes in GeneBank by BLAST N software and the result showed that the sequence of P8 and that of *Pseudomonas stutzeri* with accession number Y18006 were 99% identical

Keywords: Ammonia pollution, denitrification, nitrification, *Pseudomonas stutzeri*, the Mekong Delta

* Author for correspondence: E-mail: cndiep@ctu.edu.vn