

KHẢO SÁT MẬT ĐỘ VÀ SỰ ĐA DẠNG CỦA VI KHUẨN NITRATE HÓA TRONG AO NUÔI TÔM

Phạm Thị Tuyết Ngân¹, Trần Nhân Dũng² và Dương Minh Viễn³

ABSTRACT

Little information is available on the nitrifying bacteria community in intensive shrimp culture systems. Study on the dynamics of this group of bacteria in the shrimp ponds would help manage the pond more efficiently. A study on density, diversity and predominant species of nitrifying bacteria in a shrimp pond was conducted at a shrimp farming area in Soc Trang. Sediment samples were collected in two ponds at the beginning, middle and the end of culture period. Density of bacteria was determined by the classical method (Most Probable Number) and a molecular technique (Real Time-PCR). Diversity of nitrifying bacteria was measured by the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) technique. The results showed that density of nitrification bacteria (MPN method) varied from 10^2 - 10^4 MPN/g sediment and not significantly different during sampling duration. Densities of *Nitrosomonas* varied from 10^2 - 0.7×10^3 MPN/g and of *Nitrobacter* varied from 1.2×10^3 - 9.1×10^7 MPN/g by RT-PCR analysis. Community diversity was unchanged and *Nitrosomonas europaea* was the predominant species in pond sediments during the shrimp growing period.

Keywords: *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, MPN, Real-Time PCR, DGGE

Title: Study on density and biodiversity of Nitrifying bacteria on shrimp culture pond

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu và thông tin về vi khuẩn chuyển hóa đạm trong ao nuôi tôm sú thâm canh hiện nay chưa nhiều. Việc nghiên cứu động thái của nhóm vi khuẩn này trong ao nuôi tôm sú thâm canh có thể giúp cho quá trình quản lý ao nuôi hiệu quả hơn. Chính vì thế nghiên cứu về mật độ vi khuẩn, tính đa dạng và loài chiếm ưu thế của nhóm vi khuẩn chuyển hóa đạm trong ao nuôi tôm sú thâm canh đã được thực hiện ở vùng nuôi tôm sú thâm canh ở Sóc Trăng. Mẫu bùn đáy ao được thu ở 2 ao tôm thâm canh vào thời điểm đầu, giữa và cuối chu kỳ nuôi. Mật số vi khuẩn được xác định bằng phương pháp khả hữu (Most Probable Number) và sinh học phân tử (Real-time PCR). Sự đa dạng quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm được xác định bằng kỹ thuật DGGE (Điện di biến tính). Kết quả phân tích cho thấy mật số vi khuẩn chuyển hóa đạm (MPN) dao động trong khoảng 10^2 - 10^4 MPN/g bùn, không có sự khác biệt lớn qua các đợt thu mẫu. Vi khuẩn *Nitrosomonas* biến động từ 10^2 - $0,7 \times 10^3$ MPN/g. Mật độ vi khuẩn *Nitrobacter* phân tích bằng kỹ thuật RT-PCR trong khoảng $1,2 \times 10^3$ - $9,1 \times 10^7$ MPN /g bùn. Quần thể vi khuẩn không có sự biến động nhiều trong suốt vụ nuôi đã được kiểm chứng bằng kỹ thuật DGGE. Vi khuẩn chiếm ưu thế trong suốt vụ nuôi là *Nitrosomonas europaea*.

Từ khóa: *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, MPN, PCR, RealTime-PCR, DGGE

1 GIỚI THIỆU

Trong các đối tượng nuôi trồng thủy sản, tôm sú là một trong các đối tượng nuôi chính và phổ biến ở Việt Nam. Ngành nuôi tôm sú đang phát triển mạnh mẽ với

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện NC & PT công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

³ Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

mục đích gia tăng kim ngạch xuất khẩu, thúc đẩy sự phát triển kinh tế xã hội, cải thiện đời sống người dân. Mục tiêu mà ngành thủy sản đang hướng tới là nuôi tôm an toàn, hiệu quả, bền vững, thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, xu hướng gia tăng mật độ để tăng năng suất, dẫn đến việc tích tụ các chất mùn bã hữu cơ từ thức ăn dư thừa, thuốc, hóa chất, kháng sinh làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường nuôi. Quá trình khoáng hóa Nitơ của chất hữu cơ dư thừa dễ dẫn đến tích lũy NH_4^+ nếu không có quá trình nitrate hóa tiếp theo để chuyển hóa NH_4^+ thành NO_3^- nhằm giảm thiểu sự hình thành khí độc NH_3 trong môi trường ao nuôi. Để giải quyết vấn đề này một trong những biện pháp hiệu quả và đang được khuyến khích là sử dụng chế phẩm sinh học có chứa các chủng vi khuẩn thúc đẩy quá trình nitrate hóa như *Bacillus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* (Gromen *et al.*, 2001; Stephen *et al.*, 1996). Ngoài ra, các nghiên cứu đánh giá xem các chủng vi sinh vật khi đưa vào môi trường nuôi có tồn tại và phát triển hay không và nghiên cứu khảo sát sự biến động thành phần của vi khuẩn nitrate hóa trong ao nuôi tôm sú thâm canh chưa được ghi nhận.

Vi khuẩn oxy hóa ammonium *Nitrosomonas* thành nitrate (ammonium oxidation bacteria – AOB) được biết là nhóm vi khuẩn khó phân lập và nuôi do chúng không có khả năng sống trên môi trường thạch và không thể hình thành khuẩn lạc trong điều kiện thời gian cho phép (Trần Cẩm Vân, 2005; Herbert, 1999; Hesselsoe, 1998). Vì vậy, để xác định mật độ vi khuẩn không thể áp dụng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa. Một phương pháp được sử dụng phổ biến để đếm số lượng của vi khuẩn AOB là kỹ thuật MPN (Most Probable Number) (Morrill và Dawson, 1967; Belser và Schmidt, 1981; Macfarlane và Herbert, 1984). Tuy nhiên, hiệu quả của kỹ thuật tương đối thấp và mức độ chính xác về mặt thống kê cũng không cao (Herbert, 1999)... Nổi bật hơn là những kỹ thuật mới về sinh học phân tử như PCR định lượng (Phillips *et al.*, 2000; Hermansson *et al.*, 2001). Vì vậy để xác định chính xác mật độ vi khuẩn tham gia chuyển hóa đạm cần áp dụng phương pháp chính xác hơn như PCR định lượng, hoặc DGGE.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương pháp thu mẫu

Mẫu nước và bùn đáy ao được thu vào đầu vụ, giữa vụ, cuối vụ tại 2 ao nuôi tôm sú thâm canh ở Sóc Trăng. Ao nuôi được bón chế phẩm vi sinh Eco Marine mỗi tuần một lần theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Diện tích ao nuôi 0,5 ha/ao. Thức ăn cho tôm của Cty. CP. Mật độ tôm giống thả nuôi 30con/m². Tại mỗi vị trí thu khoảng 100g bùn (Chinabut *et al.*, 2003). Mẫu sau khi thu được trữ lạnh tại chỗ bằng nước đá sau đó chuyển về phòng thí nghiệm trong 3-5h, bảo quản ở 4°C và phân tích trong vòng 2h.

2.2 Phân tích mẫu

2.2.1 Phương pháp xác định chất lượng nước trong môi trường ao nuôi

Các chỉ tiêu như nhiệt độ, pH, đều được ghi nhận trước khi tiến hành thu mẫu. Các chỉ tiêu thủy hóa (DO, TAN, NO_2^- , NO_3^- , TSS, TN, TOM) được thu cùng thời điểm với thu mẫu vi sinh. Tất cả các chỉ tiêu môi trường được phân tích theo phương pháp chuẩn (APHA *et al.*, 1995).

2.2.2 *Xác định mật số vi khuẩn nitrate hóa bằng phương pháp MPN (Ehrlich, 1975)*

Nitrosomonas và Nitrobacter

Xác định mật số vi khuẩn bằng phương pháp số khả hữu (MPN) (Ehrlich, 1975)

Chuẩn bị môi trường tiệt trùng ammonium-calcium-carbonate (1 L) cho MPN của nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonium (*Nitrosomonas*): (NH₄)₂SO₄ (0,5g); K₂HPO₄ (1g); FeSO₄.7H₂O (0,03g); NaCl (0,3g); MgSO₄.7H₂O (0,3g); CaCO₃ (7,5g).

Chuẩn bị môi trường tiệt trùng nitrite-calcium-carbonate (1 L) cho MPN nhóm vi khuẩn oxi hóa nitrite (*Nitrobacter*) KNO₂ (0,006g); K₂HPO₄ (1g); NaCl (0,3g); MgSO₄.7H₂O (0,1g); CaCO₃ (1g); CaCl₂ (0,3g).

Thuốc thử Griess – Ilosway

Dung dịch A: Hoà tan 0,6 g sunfanilic acid trong 10 mL nước cất nóng (90°C), để nguội cho thêm 20 mL HCl đậm đặc. Pha loãng hỗn hợp này thành 100 mL với nước cất rồi trộn đều. *Dung dịch B:* Hoà tan 0,6 g, α -naphylamine trong 10-20 mL HCl đậm đặc, pha loãng thành 100 mL với nước cất và trộn đều. *Dung dịch C:* Hoà tan 16,4 g sodium acetate trong nước cất, pha loãng thành 100 mL với nước cất sau đó trộn đều. Bảo quản riêng biệt từng dung dịch này trong 3 chai tối, giữ trong tủ lạnh, thời gian sử dụng không quá 1 tháng. Hỗn hợp kẽm-đồng-manganese dioxide: trộn đều 1 g bột kim loại Zn, 1g MnO₂ và 1g bột kim loại Cu.

Đếm mật số *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* bằng phương pháp MPN: Đếm vi khuẩn trong 1gam mẫu bùn trong các ống nghiệm chứa môi trường trên. Mẫu bùn được pha loãng ở các nồng độ từ 10¹-10⁵, 3 lần lập lại. Ủ các ống nghiệm ở 28°C trong 21 ngày.

Kiểm tra sự có mặt của NO₂⁻ ở các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn và các ống đối chứng âm bằng thuốc thử Griess-Ilosway.

Tra cứu bảng 1-MPN tiêu chuẩn để xác định số lượng có thể có của nhóm AOB và NOB trong 1gam mẫu bùn.

2.2.3 *Xác định mật số vi khuẩn nitrate hóa bằng kỹ thuật Real-time PCR (RT-PCR)*

Ly trích ADN và tinh sạch ADN dựa theo mô tả của Boon *et al.*, (2002)

Xác định mật số vi khuẩn *Nitrosomonas* bằng kỹ thuật Real-time PCR

Qui trình PCR: Dòng vi khuẩn chọn làm đối chứng dương là *Nitrosomonas europaea* NCIMB 11849 được cung cấp bởi Đại học Leuven, Bỉ. Trong qui trình PCR, cặp mồi chuyên biệt cho vi khuẩn *Nitrosomonas europaea* có trình tự như sau: New1265F: 5'-GCCAATCTCAAAGCAC-3'. New1422R: 5'-TCTGGTGAAAACCACTCC - 3' (Ludwig *et al.*, 2004). Qui trình nhiệt gồm 35 chu kỳ, 95°C (10'); 95°C (1'); 55°C (1'); 72°C (1'); 72°C (10').

Qui trình RT-PCR Qui trình nhiệt: 35 chu kỳ, 95°C (10'); 95°C (1'); 55°C (1'); 72°C (1'); 72°C (10')

Xác định mật số vi khuẩn *Nitrobacter* bằng kỹ thuật Real-time PCR:

Qui trình PCR : Dòng vi khuẩn chọn làm đối chứng dương là *Nitrobacter winogradskyi* (ATCC 25381) phân lập từ ao nuôi tôm sú thâm canh được định danh bằng kỹ thuật giải trình tự tại Viện CNSH, Đại học Cần Thơ (Phạm Thị Tuyết Ngân, 2010). PCR sử dụng cặp mồi chuyên biệt cho vi khuẩn *Nitrobacter* nhằm vào 16S rRNA Nwi70F 5'-GGCGTAGCAATACGTCAG -3'; Nwi165R 5'-ATCCGGTATTAGCCCAAG -3' (Ludwig *et al.*, 2004). Quy trình nhiệt: 35 chu kỳ với các điều kiện phản ứng: 95°C (3'), 95°C (45'), 47°C (40'), 72°C (1'), 72°C (3'). Điện di trong agarose gel 1,5%.

Qui trình RT-PCR: Qui trình nhiệt: 40 chu kỳ với các điều kiện phản ứng: 95°C (3'); 95°C (45''); 47°C (45''), 72°C; (1'); 72°C (3'). Điện di kiểm tra kết quả trong agarose gel 1,5%.

2.2.4 *Xác định sự đa dạng quần thể vi khuẩn bằng kỹ thuật DGGE*

Sự đa dạng của quần thể vi khuẩn trong bùn đáy ao nuôi tôm được đánh giá dựa trên kết quả chạy điện di biến tính cho sản phẩm PCR của khuôn mẫu DNA trích từ bùn đáy ao vào các thời điểm nuôi khác nhau với cặp mồi đa tương thích (general primers for bacteria) nhằm vào 16S rRNA F984-GC/R1378 (Gelsomino, *et al.*, 2006).

Chu trình nhiệt cho PCR: 94°C (5'); 94°C (1'); 53°C (1'); 72°C (2'); 72°C (10'). Điện di biến tính chạy trên acrylamide gel nồng độ urea 40-60%, điện thế 45V trong 16h, chạy trên máy Biorad Dcode trong môi trường TAE 1X, nhiệt độ 60°C (Muyzer *et al.*, 1993). Sau khi điện di gel được nhuộm trong 20 phút bằng thuốc nhuộm Ethidium bromide. Mẫu sau khi nhuộm lập tức cho vào hệ thống có chụp hình qua tia tử ngoại, UV và nối với máy ảnh (Vibert Louramat, Pháp). Các sản phẩm PCR có kích thước trình tự, khác nhau bị biến tính trong quá trình điện di. Sự hiện diện của các vạch xác định sự đa dạng của quần thể vi sinh vật.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Biến động các yếu tố môi trường

Bảng 1: Các chỉ tiêu chất lượng nước

Thời vụ	Nhiệt độ (°C)	Độ mặn (‰)	pH	DO (mg/L)	NO ₂ ⁻ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	TAN (mg/L)	TSS (mg/L)	TN (mg/L)	TOM (%)
Đầu	30	18	8,0	8	0,03	0,17	0,40	20,8	0,70	6,5
Giữa	28	16	8,1	7	0,06	0,65	0,55	120,5	0,98	10,5
Cuối	26	10	8,3	6	0,05	0,90	0,65	190,0	0,80	5,5

Nhiệt độ trong thời gian thu mẫu dao động từ 26-30°C (Bảng 1), thích hợp cho sự phát triển của tôm và nhóm vi khuẩn nitrate hóa (Boyd, 1998)). Độ mặn biến động không đáng kể, thích hợp cho các giai đoạn phát triển của tôm 15-25‰. pH biến động không đáng kể và sự có xu hướng tăng nhẹ theo thời gian nuôi, phù hợp cho nuôi tôm (Briggs and Funge 1994). Tổng vật chất lơ lửng trong ao (TSS) có khuynh hướng tăng dần theo thời gian nuôi.

Oxy hòa tan (DO) biến động khá lớn (4-8mg/L). Hàm lượng TAN (NH₄⁺/NH₃) dao động khoảng 0,4 - 0,65mg/L được hình thành do sự phân hủy đạm hữu cơ. Theo Chanratchkool *et al.*, (1995) thì NH₃ dễ bị thoát ra ngoài môi trường dưới tác dụng của quạt nước và sự chuyển hóa thành NH₄⁺. Hàm lượng TAN thích hợp cho ao

nuôi tôm là 0,2-2mg/L và hàm lượng NH₃ phải nhỏ hơn 0,1mg/L (Boyd,1998). Hàm lượng NO₂⁻ rất thấp (0,03-0,06mg/L) và có xu hướng tăng dần do tích lũy vật chất hữu cơ trong ao nuôi. Theo Whatstone *et al* (2002) nồng độ NO₂⁻ trong ao nuôi tôm phải nhỏ hơn 0,23 ppm được xem là an toàn cho tôm. NO₃⁻ Dao động ở mức thấp (nhỏ hơn 1mg/L). Đầu vụ hàm lượng NO₃⁻ 0,2mg/L. Sự biến động NO₃⁻ trong các ao nuôi thâm canh có liên quan rất lớn đến mức độ tích lũy vật chất dinh dưỡng. Hàm lượng NO₃⁻ tăng cao có thể là do mật độ vi khuẩn *Nitrobacter* đã tăng cao trong ao nuôi tham gia chuyển hóa NO₂⁻ sang NO₃⁻. Theo Boyd (1998), hàm lượng NO₂⁻ cho phép trong ao nuôi thủy sản là nhỏ hơn 10mg/L, tốt nhất là nhỏ hơn 2mg/L.

Tổng đạm (TN) tăng dần và đạt cao nhất vào giữa vụ (0,98mg/L), sau đó giảm dần đến cuối vụ (0,80mg/L). Sự tích lũy hữu cơ đáy ao (TOM), có khuynh hướng tăng cao vào giữa vụ và giảm vào cuối vụ nuôi. pH tương đối ổn định và mật độ vi khuẩn trong bùn tăng dần theo thời gian nuôi làm cho quá trình phân hủy diễn ra nhanh chóng nên chất hữu cơ không tích lũy nhiều mà có xu hướng giảm. Việc cải tạo ao trước mỗi vụ nuôi là nhân tố quan trọng làm giảm thiểu sự tích lũy hữu cơ ở đáy ao. Theo Boyd (1998) sự phân hủy vật chất hữu cơ ở đáy ao sẽ diễn tiến nhanh chóng ở pH 7-8.

3.2 Biến động mật số vi khuẩn nitrate hóa bằng phương pháp MPN

Kết quả xác định mật độ vi khuẩn nitrate hóa được thể hiện qua Bảng 2. Qua Bảng 2 và 3 cho thấy nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonium (AOB) dao động khoảng $1,1 \times 10^2$ - $4,6 \times 10^4$ MPN/g. Kết quả nghiên cứu này tương tự với một số nghiên cứu trước đó về xác định mật số vi khuẩn nitrate hóa bằng phương pháp MPN như Kemedtsson *et al.*, (1998) ghi nhận mật vi khuẩn dao động $10^3 - 10^5$ MPN/g ở độ pH đất từ 5-6. Herbert (1999) lại khảo sát thấy trong khoảng 10^2 - 10^4 MPN/g. Hesselsoe *et al.* (2001), khảo sát $1,79 \times 10^3$ MPN/g. Ngoài ra trong một nghiên cứu khác của Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010), biến động mật độ vi khuẩn nitrate hóa bằng phương pháp MPN trong ao nuôi tôm sú thâm canh dao động từ 7 đến $2,6 \times 10^3$ MPN/g. Theo sự phân loại về mặt hình thái và sinh lý cho thấy *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosobolus*, *Nitrosospira* và *Nitrosovibrio* nhìn chung được xem là tác nhân oxi hoá ammonia còn *Nitrobacter*, *Nitrospiro*, *Nitrospira* và *Nitrococcus* là tác nhân oxi hoá nitrite (Watson *et al.*, 1989 and Block *et al.*, 1992).

Tương tự nhóm oxi hoá ammonium (AOB) mật độ nhóm oxi hóa nitrite (NOB) dao động từ $2,1 \times 10^2$ đến $2,9 \times 10^4$ tế bào/g. Những báo cáo về mật độ nhóm NOB của các tác giả như Degrange và Bardin (1995) xác định NOB từ trong đất dao động trong khoảng 10^2 hoặc 10^3 MPN/g. Rennie và Schmid (1997) lại cho biết mật độ của chúng cao hơn từ 10^3 - 10^4 MPN/g. Cũng trong nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010), khảo sát biến động mật độ vi khuẩn nitrite hóa bằng phương pháp MPN trong ao nuôi tôm sú thâm canh dao động từ 5,5 đến $2,6 \times 10^3$ MPN/g. Hoạt động và phát triển của nhóm NOB thường bị ức chế bởi các yếu tố môi trường như nồng độ NH₃, pH cao, DO và nồng độ NO₂⁻ thấp, nhiệt độ thấp.

Từ các kết quả trên cho thấy khi phân tích bằng phương pháp MPN mật số vi khuẩn thường dao động nhỏ hơn 10^4 MPN/g. Phương pháp dựa trên độ pha loãng

và sự biến đổi màu của dung dịch, quá trình phân tích kết quả trong khoảng thời gian dài (>21 ngày) chính vậy tốn thời gian và không thể kiểm soát ảnh hưởng của môi trường, hóa chất... Theo Bruns *et al.* (1999) mật số vi khuẩn khi xác định bằng phương pháp MPN bị ảnh hưởng bởi nồng độ amoni sunfat trong môi trường nuôi vi khuẩn dễ gây nhầm lẫn, độ chính xác không cao, không thích hợp cho huyền phù vi sinh vật có mật độ thấp.

3.3 Biến động mật số vi khuẩn *N. europaea* bằng kỹ thuật Real – time PCR

Bảng 2: Biến động mật số *N. europaea* bằng phương pháp MPN và Real-time PCR

<i>Thời vụ</i>	<i>Phương pháp MPN (MPN/g)</i>	<i>Phương pháp RT-PCR (MPN /g)</i>
Đầu vụ	$1,1 \times 10^2$	10^2
Giữa vụ	$4,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
Cuối vụ	$2,4 \times 10^3$	$0,7 \times 10^3$

Kết quả xác định mật độ *N. europaea* bằng phương pháp Real-time PCR được thể hiện trong Bảng 3. Qua Bảng này cho thấy mật độ vi khuẩn *N. europaea* qua các đợt thu mẫu nằm trong khoảng từ 10^2 đến $2,8 \times 10^4$ MPN/g. Có sự biến động trong mùa vụ, đầu vụ mật độ vi khuẩn 10^2 tế bào/g bùn, cao nhất giữa vụ 10^4 MPN/g. Vào cuối vụ nuôi mật độ vi khuẩn giảm nhưng không đáng kể $0,7 \times 10^3$ MPN/g bùn. Mật độ vi khuẩn AOB tương đối ít biến động hơn so với nhóm NOB có thể do AOB dễ thích nghi với sự thay đổi môi trường. Dựa trên kết quả phân tích bằng phương pháp MPN, mật số vi khuẩn *Nitrosomonas* dao động trong khoảng $1,1 \times 10^2$ đến $4,6 \times 10^4$ MPN/g. Giống *Nitrosomonas* thường phân bố rộng rãi trong đất, bùn nước ngọt và nước lợ (Schmidt và Belser, 1994; Degrange và Bardin, 1995; Kuenen và Robertson, 1998), trong đó *N. europaea* chiếm số lượng cao (Montras, 2007). Nếu so sánh 2 phương pháp nhận thấy mật số gần tương đương nhau, trong trường hợp này có thể kết luận loài ưu thế trong nhóm vi khuẩn tham gia giai đoạn đầu của quá trình nitrate hóa là *N. europaea*, mặc dầu theo lý thuyết có 4 nhóm vi khuẩn tham gia vào quá trình nitrate hoá: *Nitrosomonas*, *Nitrozocystis*, *Nitrozolobus* và *Nitrosospira*. Nhưng các nhóm còn lại có lẽ không hoặc hiện diện ít trong môi trường. Hầu hết các nghiên cứu bằng phương pháp sinh học phân tử cho kết quả cao hơn, nhanh hơn so với phương pháp truyền thống MPN. Qua đó cho thấy sử dụng RT-PCR xác định mật số vi khuẩn nitrate hóa chính xác và nhanh chóng hơn.

3.4 Sự biến động mật số vi khuẩn *Nitrobacter* bằng kỹ thuật Real time-PCR

Mật độ trung bình nhóm NOB trong bùn đáy ao dao động từ 10^2 - 10^4 MPN/g bùn (Bảng. 3). Trong khi đó phân tích với kỹ thuật RT-PCR mật số dòng vi khuẩn *N. winogradski* (ATCC 25381) dao động từ 10^3 - 10^7 CFU/g cao hơn MPN và có sự biến động rõ rệt qua các đợt thu mẫu nhưng sự khác biệt giữa các ao không đáng kể. Qua kết quả phân tích này cho thấy, áp dụng phương pháp MPN có nhiều nhược điểm, có thể lúc pha loãng mẫu chưa thích hợp. *Nitrobacter* thuộc lớp phụ α -Proteobacteria phân bố ở nước ngọt, lợ, đất, bùn và đá (Grommer, 2005). Trong 4 giống thuộc nhóm vi khuẩn NOB chỉ có *Nitrobacter* được chứng minh có nhiều trong đất và bùn (Schmidt và Blser, 1994; Degrange và Bardin, 1995; Kuenen và Robertson, 1988), nhóm vi khuẩn này giữ vai trò quan trọng nhất trong bước thứ hai của quá trình nitrate hoá, nhưng chỉ có 2 loài được xác định là *N. winogradskyi*

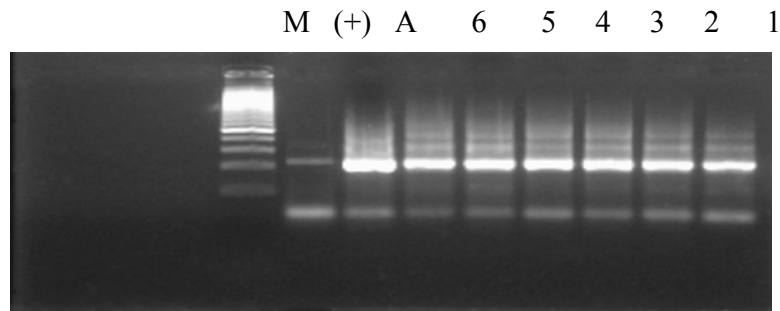
và *N. agilis* (Breed et al., 1957). Như vậy trong mẫu phân tích loài chiếm ưu thế là *N. winogradskyi*.

Bảng 3: mật số *Nitrobacter* bằng phương pháp MPN và RT-PCR

Thời vụ	Phương pháp MPN (MPN/g)	Phương pháp RT-PCR (MPN/g)
Đầu vụ	$2,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3 - 2,1 \times 10^3$
Giữa vụ	$2,9 \times 10^4$	$3,0 \times 10^6 - 9,1 \times 10^7$
Cuối vụ	$1,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4 - 7,74 \times 10^4$

3.5 Xác định sự đa dạng quần thể bằng kỹ thuật DGGE

3.5.1 Sản phẩm PCR

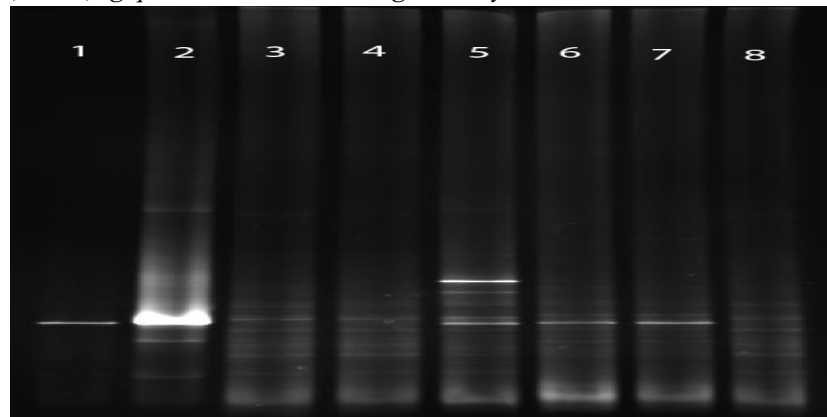


Hình 1: Sản phẩm PCR khuếch đại với mồi 984f-GC và 1378R

Chú thích M: Thang 200bp, (+) đối chứng dương band A: 4 dòng vi khuẩn, Band 1,2,3 Ao 1: đầu vụ, giữa vụ, cuối vụ, Band 4,5,6 Ao 2: đầu vụ, giữa vụ, cuối vụ

Kết quả sản phẩm PCR được khuếch đại được trình bày trong Hình 1. Vạch sản phẩm PCR của tất cả các mẫu có kích thước tương ứng với vạch 400bp vì mồi 984f-GC và 1378R bắt cặp tốt với đoạn gen trong khoảng 420bp.

3.5.2 Sự đa dạng quần thể vi khuẩn trong bùn đáy ao



Hình 2: Cấu trúc quần thể vi khuẩn trong bùn đáy ao nuôi tôm

Chú thích: Mỗi vạch trên mỗi giếng tương ứng với một loài vi khuẩn (giếng 1: Vi khuẩn thuần *N. europaea* làm đối chứng dương; giếng 2: hỗn hợp 4 dòng vi khuẩn *Nitrosomonas*; giếng 3,4: mẫu Đầu vụ: Ao 1,2; giếng 5,6: mẫu bùn Giữa vụ Ao 1,2; giếng 7,8: mẫu bùn Cuối vụ Ao 1,2)

Kết quả về cấu trúc quần thể vi khuẩn nitrate hóa trong ao nuôi tôm sú thâm canh trong các đợt thu mẫu được thể hiện trong Hình 2. Kết quả phân tích sự đa dạng của quần thể vi khuẩn oxi hóa amonium trong các mẫu bùn thu từ ao nuôi tôm sú

thâm canh được thể hiện trên sắc đồ DGGE của đoạn 16S rADN khuếch đại bằng PCR với cặp mồi 984F-GC và 1378R. Trên các giếng của các mẫu bùn xuất hiện khá nhiều vạch cho thấy thành phần vi khuẩn trong ao nuôi tôm sú thâm canh khá đa dạng nhưng loài chiếm ưu thế trong suốt vụ nuôi là *Nitrosomonas europaea*.

Trong tất cả các giếng đều có số lượng và vị trí các vạch tương đương nhau. Cho thấy thành phần của quần thể vi khuẩn trong ao nuôi tôm sú không có sự biến động lớn trong suốt vụ nuôi. Tuy nhiên, có sự xuất hiện của một số loài chiếm ưu thế, có thể do sự biến đổi các yếu tố môi trường thích hợp với điều kiện sống đặc trưng cho loài. Độ sáng và vị trí của vạch trên giếng 5,6,7 (mẫu giữa và cuối vụ nuôi) tương đồng cao với *N. europaea*. Chứng tỏ loài này luôn tồn tại trong ao nuôi tôm và là loài chiếm ưu thế so với các loài khác vào giữa và cuối vụ nuôi khi hàm lượng vật chất hữu cơ trong ao bắt đầu tích lũy cao. Các chủng vi khuẩn tương đồng với *N. europaea* đã được định danh như là vi khuẩn giữ vai trò oxy hóa amonium và nitrite. Đồng thời từ kết quả phân tích MPN cho thấy mật độ tổng vi khuẩn *Nitrosomonas* $5,6 \times 10^4$ MPN/g, trong khi kết quả phân tích mật số *N. europaea* chiếm $2,8 \times 10^4$ MPN /g bùn. Cho thấy *N. europaea* là loài chiếm đa số và có vai trò quan trọng trong số vi khuẩn thuộc nhóm AOB có khả năng oxi hóa amonium.

Tương tự với nghiên cứu của Gorra *et al.*, (2007) khi nghiên cứu mối quan hệ giữa môi trường và sự đa dạng của các quần thể vi khuẩn oxy hóa ammonia trong một vùng đất ngập nước được xây dựng để xử lý nước thải. Các mẫu được thu quanh năm. Sự đa dạng của quần thể vi khuẩn được xác định bằng phương pháp PCR-DGGE dựa trên các gen 16S rARN. Kết quả cho thấy trung bình qua các mùa, không có sự khác biệt lớn về thành phần của quần thể vi khuẩn oxy hóa ammonia của phân lớp β - *Proteobacteria*. Chỉ có các trình tự liên quan đến chủng *Nitrosospira* đã được phát hiện khi hiệu suất Zeolite đạt cao nhất. Theo Wang *et al* (2009) khi phân tích ảnh hưởng của nitrogen lên sự đa dạng thành phần vi khuẩn oxy hóa ammonia trong đất bằng kỹ thuật DGGE cho thấy rằng có sự tồn tại của các nhóm *Nitrosomonas maria*, *N. oligotropha*, *N. communis*, *Nitrosococcus mobilis*, *Nitrosospira spp.* Việc tăng hàm lượng N đã làm gia tăng nồng độ NH_4^+ , thúc đẩy sự phát triển nhóm vi khuẩn *Nitrosomonas spp* nhưng không thấy sự phát triển nhóm *Nitrosospira*. Cũng giống với nghiên cứu của Hornek *et al* (2006) khi phân tích mẫu bùn thu được từ bể sục khí của nhà máy xử lý nước thải ở Áo. Bằng kỹ thuật PCR và DGGE với đoạn mồi chuyên biệt amoA 1F và amoA2R cho thấy sự đa dạng của quần thể vi sinh vật và vai trò chủ yếu thuộc nhóm AOB với hiện diện của các dòng *Nitrosomonas lineages*. *N. Europaea*, *N. mobilis*, *N. eutropha Nm57*, *N. halophila Nm1*, *N. mobilis*; (II) *N. communis lineage*: *N. communis Nm2*, *N. nitrosa Nm90* (III) *Nitrosomonas marina*....nhưng *Nitrosomonas sp*, *N. europaea* vẫn là loài chiếm ưu thế trong các dòng có khả năng chuyển hóa đạm cao.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Đã thành công khi phát triển xác định mật số, tính đa dạng và loài chiếm ưu thế của nhóm vi khuẩn Nitrate trong môi trường ao nuôi tôm sú thâm canh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Kỹ thuật Real Time PCR – Sybr Green cho kết quả chính xác, nhanh. Đã xác định được mật số vi khuẩn *Nitrosomonas europaea* dao động trong khoảng 10^2 đến $2,8 \times 10^4$ tế bào/g bùn. Mật số vi khuẩn *Nitrobacter* biến động

trong khoảng $1,2 \times 10^3$ đến $9,1 \times 10^7$ tế bào/g bùn trong suốt quá trình nuôi. Đa dạng của quần thể các vi khuẩn đã được xác định bằng kỹ thuật DGGE. Thành phần vi khuẩn rất đa dạng với hơn 10 loài. Vi khuẩn chiếm ưu thế có chức năng oxy hóa amonium được phát hiện trong bùn có sự tương đồng cao với *N. europaea*.

4.2 Đề xuất

Phương pháp RT-PCR định lượng cho kết quả nhanh chóng, chính xác. Tuy nhiên, quy trình thực hiện còn khá phức tạp nên khó ứng dụng đại trà. Tiếp tục nghiên cứu để tối ưu và đơn giản hóa phương pháp. DGGE được xem là một trong những phương pháp mới nghiên cứu về sự đa dạng của quần thể vi sinh vật. Bước đầu đã thành công khi nghiên cứu về sự đa dạng của quần thể vi khuẩn Nitrate hóa trong ao nuôi tôm sú thâm canh. Nên tiếp tục nghiên cứu trên nhiều hệ sinh thái khác nhau để đa dạng hóa, tối ưu hóa phương pháp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., Washington, DC, USA.
- Boon N., DeWindt, W., Vertraete, W., Top, E.M., 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primer for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiology Ecology Vol. 39, 101-12.
- Boyd E B, 1998. Water Quality for Pond Aquaculture. Research and Development Series No. 3. International Center for Aquaculture Fisheries Management 24, 789-811.
- Briggs, M.R.P., Funge-Smith, S.J., 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. Aquaculture and Fisheries Management 25, 789-811.
- Bruns, M A J R Stephen, G A Kowalchuk, J I Prosser, E A Paul, 1999 Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils Appl Environ Microbiol. Jul ;65 :2994-3000.
- Chanratchakool, P., J.F. Turnbull, S.J. Funge-Smith, I.H. Macrae và C. Limsuwan., 1995. Quản lý sức khoẻ tôm trong ao nuôi. Tài bản lần thứ 4. Người dịch: Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Thanh Phương, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trần Ngọc Hải. Bộ Thủy Sản. 2003- 153p
- Chinabut S., T. Somsiri, F.Md. Yusoff, Dang thi Hoang Oanh, S. Mohamed , G. Huys, K. Barti. Nguyen Thanh Phuong, J. Swings and A. Teal. 2003. A simple device for sampling soft pond bottom sediment. Aquaculture 258 (2006) 650– 654.
- Dergange, V; and Bardin, R., 1998. Detection and Counting of Nitrobacter Population in Soil by PCR.
- Ehrlich, G. G., 1975. Water quality: Analytical Methods - "Nitrifying bacteria (most probable number, MPN, method)" in: quality of water branch technical memorandum. R. J. Pickering No. 75.13 p.
- Gelsomino Antonio and Giovanni Cacco, 2006. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis
- Gorra, R., M. Coci., R. Ambrosoli, H.J. Laanbroek, 2007. Effects of substratum on the diversity and stability of ammonia- oxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment. J Appl microbiol, 103: 1442-52
- Grommen, R., Verhaege, M. & Verstraete, W. (2005). Removal of nitrate in aquaria by means of electrochemically generated hydrogen gas as electron donor for biological denitrification. Aquacultural Engineering, (ingediend voor publikatie/submitted for publication).

- Herbert, R.A., 1999. Nitrogen Cycling in Coastal Marine Ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 563-590.
- Hesselsøe, M., and J. Sørensen. 1999. Microcolony formation as a viability index for ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28:383–391.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., and Woldendorp, J.W. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1489-1497.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Kumar, Y., Buchner, A., Lai, Tsteppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhar, A., Gross, O., Grumann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, T., Bode, A., Scheleifer, K., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363-1371
- Macfarlane G.T. and Herbert, R.A. 1984. Dissimilatory Nitrate Reduction and Nitrification in Estuarine Sediments. *Journal of General Microbiology* 130 (1984), 2301-2308; DOI 10.1099/00221287-130-9-2301.
- Muyzer G., E. C.D. Waal, A. G. Uitterlinden. 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: 695-700
- Phạm Thị Tuyết Ngân, Nguyễn Hữu Hiệp, 2010. Biến động mật độ vi khuẩn hữu ích trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) thâm canh. Trong tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ, 2010, số 14, trang 166-176.
- Rennie, R.J; Schmidt, E.L., 1977. Immunofluorescence Studies of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* Populations in Soils.
- Romana Hornek, Hand-Peter Koops, Andreas H. Farnleitner, Alexander Kirschner, 2006. primers containing universal bases reduce multiple amoA gene specific DGGE band patterns when analysing the diversity of beta-amonia oxidizer in the environment, *Journal of microbiological methods.* 66: 147-155
- Rothauwe, J.-H., K.-P. Witzel, and W. Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4704–4712.
- Schmidt E.L., and Belsler, L.W., 1994. Autotrophic nitrifying bacteria. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, PS (Eds). *Methods of soil analyses part 2: Microbiological and biochemical properties*, soil science society of America, Madison, WI, pp. 159-177.
- Stephen, J. R., A. E. McCaig, Z. Smith, J. I. Prosser, and T. M. Embley. 1996. Radionuclides, p. 55–62. In R. E. Hinchee, J. L. Means, and D. R. Burris (ed.), *Bioremediation of inorganics*. Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium, no. 10. Battelle Press. Columbus, Ohio.
- Trần Cẩm Vân, 2005. Vi sinh vật môi trường. NXB Đại học quốc gia Hà nội, trang 89-108.
- Wang Y., Xiubin Ke, Liqin wu Yahai Lu. 2009. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization. *ScienceDirect. Systematic and Applied Microbiology* 32, 27-36.
- Watson, S. W., E. Bock, H. Harms, H. P. Koops, and A. B. Hooper. 1989. Family Nitrobacteraceae Buchanan 1917, 349, emend. mut. char. Starkey 1948, 69; Watson 1971a, 262AL, p. 1808–1834. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Whetstone, J.M., G. D. Treece, C. L. B and A. D. Stokes, 2002. Opportunities and Constraints in Marine Shrimp Farming. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) publication No. 2600 USDA.