

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG TRẦM TÍCH BIỂN TẠI QUẦN ĐẢO TRƯỜNG SA BẰNG PHƯƠNG PHÁP TRUYỀN THỐNG KẾT HỢP KỸ THUẬT ĐIỆN DI BIẾN TÍNH

ĐỖ THỊ TUYẾN ⁽¹⁾, ĐỖ THỊ THU HỒNG ⁽¹⁾, NGUYỄN THU HOÀI ⁽¹⁾,
NGÔ CAO CƯỜNG ⁽¹⁾, LÊ VĂN THẮNG ⁽¹⁾, ĐẶNG THỊ HỒNG PHƯƠNG ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quần đảo Trường Sa, tỉnh Khánh Hòa giữ vị trí chiến lược đặc biệt quan trọng của Việt Nam. Bên cạnh các giá trị về chính trị, kinh tế, quần đảo Trường Sa được đánh giá là nơi có độ đa dạng sinh học cao với hệ sinh vật biển đặc hữu, trong đó nhiều loài quý hiếm có giá trị đã được công bố, bao gồm các vi sinh vật biển. Tuy nhiên, việc nuôi cấy vi sinh vật ở điều kiện phòng thí nghiệm không phản ánh được đầy đủ tính đa dạng của hệ vi sinh vật biển, đặc biệt trầm tích biển [1]. Môi trường trầm tích biển có nhiều đặc điểm khác biệt như thiếu ánh sáng, hàm lượng ôxy hòa tan thấp, nồng độ muối NaCl và sulfate cao, áp suất cao tùy thuộc độ sâu, dẫn đến hệ vi sinh vật đặc thù với nhiều loài không nuôi cấy được [2]. Gần đây, sự kết hợp của các phương pháp phân tử không phụ thuộc nuôi cấy và các phương pháp truyền thống dựa vào nuôi cấy đã trở thành phương pháp tiếp cận được sử dụng để xác định và phân tích sự đa dạng của quần thể vi sinh vật mục tiêu. Điện di biến tính (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) là một trong những phương pháp nghiên cứu hệ vi sinh vật không qua nuôi cấy có hiệu quả cao, được ứng dụng phổ biến trong đánh giá đa dạng vi sinh vật ở nhiều môi trường tự nhiên khác nhau [3].

Fischer và Lerman (1983) là các nhà khoa học đầu tiên áp dụng kỹ thuật DGGE để sàng lọc các đột biến điểm trong trình tự DNA, có nghĩa là các trình tự DNA khác biệt chỉ 1 nucleotid có thể được phân tách trên gel điện di biến tính [4]. Dựa trên nguyên lý này, Muezer (1993) lần đầu tiên đưa DGGE vào ứng dụng trong phân tích đa dạng di truyền của quần thể vi sinh vật [5]. Sau đó kỹ thuật DGGE được sử dụng ngày càng phổ biến trong các nghiên cứu về cấu trúc quần thể vi sinh vật ở các môi trường sinh thái khác nhau. Yoshikazu và cs. (2003) đã khảo sát sự phân bố vi khuẩn theo độ sâu trong trầm tích hồ ura nhiệt bằng cách điện di biến tính các đoạn trình tự 16S rDNA và các đoạn 16S rRNA được phiên mã ngược. Kết quả DGGE chỉ ra sự đa dạng của vi khuẩn hoạt động giảm dần theo độ sâu kèm theo sự tích tụ của các vi khuẩn bất hoạt kết hợp với quá trình lắng cặn [6]. David (2004) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các chất ô nhiễm tới sự đa dạng của cộng đồng vi sinh vật trong trầm tích Biển Bắc dựa trên nguyên lý của kỹ thuật DGGE [7]. Cũng nghiên cứu về vi sinh vật biển tại Busan (Hàn Quốc) bằng kỹ thuật DGGE, Kim và cs. (2007) đã phân tích các đoạn 16S rDNA có tính bảo thủ cao, việc phân tách các phân đoạn gen khác nhau và giải trình tự nucleotide đã cung cấp thông tin về một số loài không thể nuôi cấy thuộc các chi *Arcobacter*, *Pseudoalteromonas* và *Vibrio* [8].

Ở Việt Nam, sự kết hợp giữa phương pháp nuôi cấy truyền thống và kỹ thuật DGGE đã được sử dụng trong một số nghiên cứu về đa dạng vi sinh vật. Vu Nguyen Thanh và cs. (2008) đã đánh giá đa dạng các loài nấm và vi khuẩn liên quan tới bánh men sử dụng trong lên men rượu truyền thống [9]. Lại Thuý Hiền và cs. (2008) đã

nghiên cứu sự đa dạng của vi sinh vật trong các mẫu nhiên liệu máy bay, hướng tới mục tiêu kiểm soát số lượng vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay của Việt Nam [10]. Nguyễn Thu Hoài và cs. (2015) đã nghiên cứu đa dạng vi khuẩn và cổ khuẩn trong trầm tích biển Nha Trang và Cát Bà bằng kỹ thuật DGGE, qua đó phát hiện một số nhóm đặc thù của môi trường biển như *Methanosarcina* và *Methanothrix* [11].

Hiện nay, các nghiên cứu về hệ vi sinh vật ở Trường Sa mới chỉ được thực hiện theo hướng tiếp cận phân lập, do vậy thông tin thu được còn ở mức khiêm tốn [12]. Hệ vi sinh vật biển ở Trường Sa cần được nghiên cứu một cách tổng quát hơn, sử dụng các phương pháp phân tử để tránh được các hạn chế của phương pháp phân lập truyền thống. Trong nghiên cứu này, kết quả bước đầu đánh giá hệ vi khuẩn trong trầm tích biển ở Trường Sa sử dụng kết hợp phương pháp nuôi cấy truyền thống và kỹ thuật DGGE được công bố, có thể làm cơ sở định hướng cho các nghiên cứu tiếp sau đối với hệ sinh thái đặc biệt này.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Ba mẫu trầm tích biển thu thập tại Đá Lát (quần đảo Trường Sa, Việt Nam), tọa độ 8°40'10"B 111°40'23"E, thời gian tháng 10/2020. Thông tin mẫu cụ thể như sau:

STT	Ký hiệu mẫu	Đặc điểm mẫu
01	ĐL1020.01	Độ sâu: 2 m; Độ mặn: 32,5‰; pH: 7,85
02	ĐL1020.02	Độ sâu: 6 m; Độ mặn: 34‰; pH: 7,92
03	ĐL1020.03	Độ sâu: 8 m; Độ mặn: 34,5‰; pH: 8,05

2.2. Trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Trang thiết bị: Máy PCR (GeneAmp™ PCR System 9700, Singapo), hệ thống điện di biến tính DGGE (VS20WAVE-DGGE, Cleaver Scientific - Anh), máy chụp ảnh gel GelDoc (BioRad, Mỹ) và một số trang thiết bị chuyên dụng khác.

- Hóa chất:

+ Nước biển nhân tạo theo Widdel (1992) [13].

+ Môi trường NA (có cải tiến): cao thịt 5 g, pepton 10 g, glucos 2 g, nước biển nhân tạo 1000 ml [14].

+ Các hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu gồm: cồn, thuốc nhuộm,...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thu thập và xử lý mẫu

Địa điểm lấy mẫu trầm tích được xác định tại khu vực quanh Đá Lát (quần đảo Trường Sa, Việt Nam). Các mẫu trầm tích được thu thập bởi các thợ lặn sử dụng thiết bị lấy mẫu chuyên dụng. Khoảng 5-7 cm phía trên của lớp trầm tích được chuyển vào hộp nhựa vô trùng cùng với nước biển từ vị trí lấy mẫu. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ thường trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm [15].

2.3.2. Phương pháp phân lập và thuần khiết các chủng vi khuẩn

Sử dụng nước biển nhân tạo pha loãng các mẫu trầm tích tới nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} . Mỗi độ pha loãng cấy trải lặp lại 3 đĩa trên môi trường NA, nuôi cấy ở 28°C trong 1-5 ngày. Mật độ tế bào vi sinh vật được xác định theo phương pháp đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch [16]. Các khuẩn lạc vi khuẩn được thu nhận và làm sạch để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu hình thái

Hình dạng, kích thước, màu sắc khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn được quan sát, mô tả và đo kích thước trực tiếp trên đĩa nuôi cấy [16]. Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử Axio Image 2 (Imager.Z2) độ phóng đại 1000×.

2.3.4. Phương pháp định danh vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S rDNA

- Tách chiết DNA chủng thuần khiết: theo hướng dẫn của bộ Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, Mỹ).

- Nhân gen: Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' và 1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' để nhân gen 16S rDNA [14].

- Giải trình tự gen và phân loại: Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự trực tiếp tại Phòng thí nghiệm 1stBase Sdn. Bhd., Malaysia. Kết quả trình tự đoạn gen được so sánh trên GenBank bằng công cụ BLAST Search. Cây phân loại được xây dựng trên phần mềm Mega 7 sử dụng phương pháp Neighbour-joining, trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều [14].

2.3.5. Phương pháp đánh giá đa dạng vi khuẩn bằng điện di biến tính

- DNA tổng số từ các mẫu trầm tích được thu nhận theo phương pháp do Zhou và cs. (1996) mô tả [17].

- PCR-DGGE: Sử dụng cặp mồi 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') và GM5F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') gắn kẹp GC (CGC CCG CCG CGC GCG GGG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) khuếch đại đoạn gen 16S rDNA [5], [18]. Phản ứng PCR với các thành phần (25 µl): 5,375 µl H₂O khử ion vô trùng, 5 µl Buffer 5×, 2,5 µl BSA (3 mg/ml), 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl dNTP (2,5 mM), 0,125 µl Taq polymerase (5 u/µl) (Thermo Scientific), 2,0 µl mồi (10 pmol/µl) mỗi loại GM5F-GC và 907R (Integrated DNA Technologies) và 3,0 µl DNA. Chu trình gia nhiệt: 94°C/5 phút, 65°C trong 1 phút, 72°C/3 phút; 19 chu kỳ của 94°C/1 phút, 65°C/1 phút và giảm dần 0,5°C sau mỗi chu kỳ, 72°C/3 phút; 14 chu kỳ tiếp theo 94°C/1 phút, 55°C/1 phút, 72°C/3 phút; 94°C/1 phút, 55°C/1 phút, 72°C/5 phút. Sản phẩm PCR sau đó được kiểm tra trên gel agarose 1% có bổ sung RedSafe trong đệm 1xTAE ở 100 V, 20 phút.

- Điện di biến tính: thực hiện theo Takeshi (2004) và có cải tiến. Điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamid 40% (tỷ lệ urea/formamid biến tính từ 30% đến 60%). Điện di được tiến hành trong 6 giờ, sử dụng đệm 1x TAE, ở 60°C, 120 V. Kết thúc điện di, nhuộm gel polyacrylamide 30 phút trong dung dịch ethidium bromua (20 µl/L), sau đó quan sát và chụp ảnh [19].

- Cắt băng và thôi gel: các băng điện di được tách và thu nhận DNA, sau đó sử dụng DNA làm khuôn cho phản ứng PCR tiếp theo.

- Nhân gen và giải trình tự các băng: các bước tiến hành tương tự như đối với chủng thuần khiết, cặp môi sử dụng là 907R và GM5F không gắn GC.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn

Tổng số 17 chủng vi khuẩn được phân lập từ 3 mẫu trầm tích (bảng 1). Có thể thấy mật độ và số chủng vi khuẩn phân lập được giảm dần khi độ sâu tăng dần. Trong đó, mẫu ĐL1020.01 có mật độ ($7,9 \times 10^3$ CFU/g) và số chủng (7 chủng) phân lập được cao nhất, mẫu ĐL1020.03 có mật độ ($3,1 \times 10^2$ CFU/g) và số chủng (4 chủng) phân lập được thấp nhất. Điều này có thể giải thích do các chủng vi khuẩn phân lập được đều là các chủng vi khuẩn hiếu khí, trong khi đó, nồng độ oxy giảm dần theo độ sâu thu mẫu làm cho sự phân bố của vi khuẩn hiếu khí tập trung chủ yếu ở tầng nước trên và giảm dần ở tầng nước sâu. Đồng thời, thực tế khi quan sát hình ảnh đĩa phân lập cũng cho thấy mẫu ĐL1020.01 có độ đa dạng hình thái khuẩn lạc hơn các mẫu còn lại.

Bảng 1. Sự phân bố của vi khuẩn trong các mẫu trầm tích

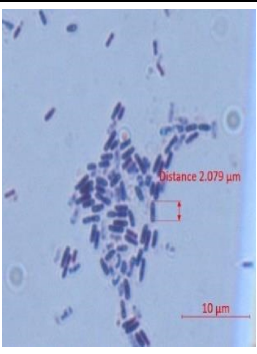
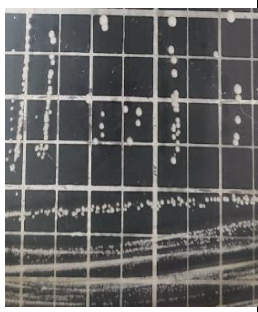
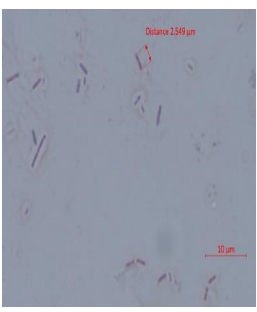
Mẫu	Mật độ (CFU/g)	KH chủng	Số chủng phân lập được
ĐL1020.01	$7,9 \times 10^3$	ĐL01.B01, ĐL01.B02, ĐL01.B03, ĐL01.B04, ĐL01.B05, ĐL01.B06, ĐL01.B07, ĐL01.B08, ĐL01.B09	9
ĐL1020.02	$4,5 \times 10^2$	ĐL02.B01, ĐL02.B02, ĐL02.B03, ĐL02.B04, ĐL02.B05, ĐL02.B06	6
ĐL1020.03	$3,1 \times 10^2$	ĐL03.B01 ĐL03.B02	2
Tổng số			17

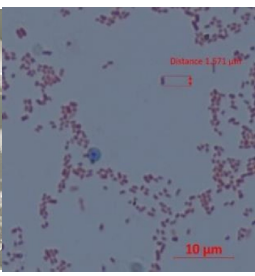
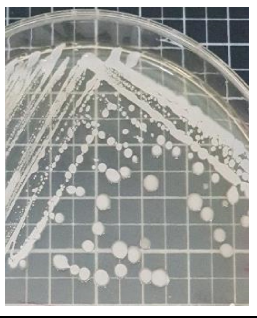
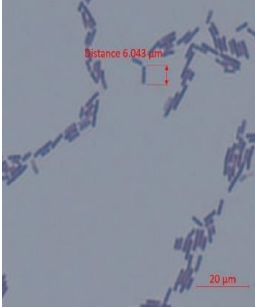
Cũng khảo sát về sự phân bố vi sinh vật, Đỗ Mạnh Hào và cs. (2010) đã thu nhận được các chủng vi khuẩn hiếu khí với mật độ trung bình 10^4 - 10^7 CFU/ml hoặc CFU/g trong các mẫu nước và trầm tích ven biển Hải Phòng. Lại Thị Thuý Hiền và cs. (2013) cũng công bố kết quả khảo sát thành phần vi sinh vật ở một số vịnh ven bờ Hạ Long, Cát Bà, Dung Quất, Quy Nhơn, Nha Trang cho thấy số lượng vi sinh vật trong trầm tích cao hơn, đa dạng hơn ở những khu vực gần bờ, gần cửa sông so với các mẫu lấy xa bờ [16]. Nghiên cứu của Tatsuhiko và cs. (2020) cũng chỉ ra sự phân tầng theo độ sâu trầm tích và sự đa dạng của các nhóm vi sinh vật giảm khi độ sâu và tuổi trầm tích tăng [20].

3.2. Đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được phân lập và làm sạch trên môi trường NA và tiến hành phân nhóm dựa vào đặc điểm hình thái của khuẩn lạc và tế bào. Việc phân nhóm này sẽ giúp thuận lợi trong việc đánh giá sự đa dạng của các vi khuẩn, đồng thời làm căn cứ cho việc triển khai các nghiên cứu tiếp theo. Các tiêu chí sử dụng để đánh giá bao gồm: khuẩn lạc (hình dạng, kích thước, màu sắc, chất tiết vào môi trường nuôi cấy), tế bào (hình dạng, kích thước, nhóm Gram, khả năng vận động, hình thành bào tử). Kết quả 17 chủng vi khuẩn được chia thành 6 nhóm hình thái (bảng 2).

Bảng 2. Hình thái các chủng vi khuẩn đại diện cho 6 nhóm

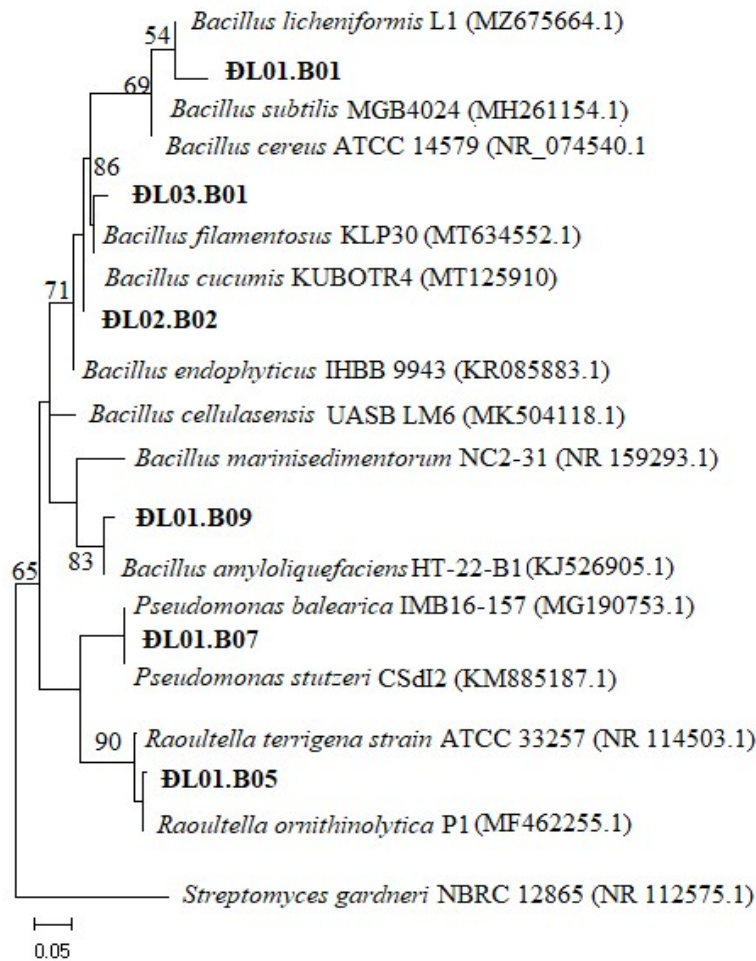
Nhóm hình thái	Ký hiệu chủng	Đặc điểm hình thái	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào (độ phóng đại 1000x)
Nhóm 1	ĐL01.B01 ĐL01.B06 ĐL01.B08	- Khuẩn lạc: hình tròn, bề mặt lớp, màu trắng, đường kính 3-5 mm, tiết chất nhầy. - Tế bào: hình que, riêng lẻ hoặc đính đôi, kích thước 0,5×2,5-3,5 µm, di động, Gram (+), có bào tử.		
Nhóm 2	ĐL01.B02 ĐL01.B09 ĐL02.B05	- Khuẩn lạc: màu trắng đục, mép rìa răng cưa, mọc lan các hướng sau 24 giờ nuôi cấy, kích thước 5-7 mm, không tiết chất nhầy. - Tế bào: hình que, xếp đơn lẻ, kích thước 0,5-1 µm × 2-2,5 µm, di động, Gram (+), có bào tử.		
Nhóm 3	ĐL01.B04 ĐL01.B07	- Khuẩn lạc: tròn, mép đều, màu trắng, kích thước 1-1,5 mm, không tiết chất nhầy. - Tế bào: hình que ngắn, đứng riêng lẻ hoặc nối dài 2-3 tế bào, Gram (-), kích thước 0,5-1×2-3 µm, di động, không có bào tử.		

Nhóm 4	ĐL01.B03 ĐL01.B05	- Khuẩn lạc: hình tròn, trắng đục, bề mặt bóng, kích thước 1-2 mm, không tiết chất nhầy. - Tế bào: hình que ngắn, xếp đơn lẻ, G (-), kích thước 0,5×1-2 μm, không di động, không có bào tử.		
Nhóm 5	ĐL02.B01 ĐL02.B02 ĐL02.B03 ĐL02.B04 ĐL02.B06	- Khuẩn lạc: dạng tròn, trắng đục, kích thước 2 - 3 mm, bề mặt bóng, có thể tiết chất nhầy xung quanh. - Tế bào: hình que, ngắn, xếp đơn lẻ, Gram (+), kích thước 0,5-1×5-6,5 μm, không di động, có bào tử.		
Nhóm 6	ĐL03.B01 ĐL03.B02	- Khuẩn lạc: hình tròn, màu trắng đục, mép rìa nan hoa, kích thước 3-5 mm, có thể tiết chất nhầy xung quanh. - Tế bào: hình que dài, xếp đơn lẻ hoặc đính đôi, kích thước 0,5-1 μm × 5-7 μm, Gram (+), di động, có bào tử.		

Như vậy có sự phân hoá rõ về hình thái các chủng vi khuẩn đại diện cho các nhóm. Trong 6 nhóm vi khuẩn, có 5 nhóm (nhóm 1 đến nhóm 5) phân bố ở trầm tích có độ sâu từ 2-6 m, chỉ có 1 nhóm (nhóm 6) gồm 2 chủng được phân lập từ trầm tích độ sâu 8 m. Cũng cần lưu ý rằng, các kết quả này chỉ giới hạn trên các đối tượng là nhóm vi khuẩn hiếu khí theo phương pháp phân lập truyền thống kết hợp với phân nhóm dựa vào hình thái khuẩn lạc, tế bào. Để đưa ra những đánh giá về sự đa dạng của nhóm vi khuẩn này trong trầm tích biển với độ tin cậy cao hơn thì cần xem xét số lượng mẫu lớn hơn kết hợp với kết quả phân tích sinh học phân tử.

3.3. Định danh các chủng vi khuẩn phân lập

Sáu chủng vi khuẩn đại diện cho mỗi nhóm được định danh gồm: ĐL01.B01, ĐL01.B09, ĐL02.B02, ĐL03.B01, ĐL01.B07, ĐL01.B05. Theo đó, trình tự đoạn gen của 6 chủng này cho thấy có độ tương đồng trên 98,7% với 6 loài khác nhau trên Genbank, cụ thể: có 4 chủng thuộc chi *Bacillus* (các chủng ĐL01.B01, ĐL01.B09, ĐL02.B02, ĐL03.B01) có độ tương đồng cao với các loài: *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. filamentosus*, *B. endophyticus* và *B. licheniformis*, 1 chủng thuộc chi *Pseudomonas* (ĐL01.B07) và 1 chủng thuộc chi *Raoultella* (ĐL01.B05) (hình 1).



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại Neighbour joining dựa trên trình tự đoạn 16S rDNA của các chủng phân lập và các loài gần gũi đã công bố trên GenBank.

(Đơn vị = 0,05 K_{nuc} trong trình tự nucleotide. Các số hiển thị ở các vị trí phân nhánh là kết quả phân tích bootstrap đối với 1000 phép so sánh.

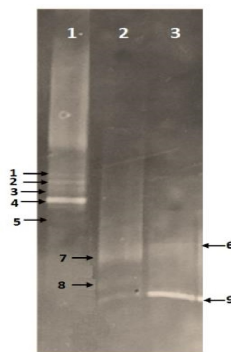
(*Streptomyces gardneri* NBRC 12865 được chọn làm nhóm ngoài)

Đây là các chủng vi khuẩn thích nghi với điều kiện dinh dưỡng cao (*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *P. balearica*) hay gây bệnh (*Raoultella*), liên quan đến sinh hoạt của người và vật nuôi. Tuy nhiên, gần đây, một số nghiên cứu chỉ ra sự xuất hiện của các loài vi khuẩn này trong các mẫu thu thập từ môi trường biển như: *B. amyloliquefaciens* nội sinh trong san hô (Cheng, 2010) hay cá biển (Junyin An, 2015); *B. licheniformis* từ trầm tích biển Cochin, Ấn Độ (Smitha, 2013); *P. balearica* từ trầm tích biển bị ô nhiễm ở Barcelona, Tây Ban Nha (Salva Serra, 2017); *Raoultella* phân lập từ động vật thân mềm hai mảnh vỏ ở biển Na Uy (Hakonsholm, 2020). Sự xuất hiện của các chủng vi khuẩn này trong mẫu trầm tích được khảo sát có thể giải thích do các mẫu này được thu nhận tại khu vực thuộc Đá

Lát, là đảo gần đất liền nhất thuộc quần đảo Trường Sa, nơi neo đậu của nhiều tàu, thuyền nên chịu ảnh hưởng nhiều bởi hoạt động xả thải của con người. Ở Việt Nam, từ các mẫu nước, bùn sa lắng, đất ven biển thuộc khu vực Bắc Bộ và miền Trung Việt Nam, Phí Quyết Tiến và cs. (2012) đã thu được 251 chủng vi khuẩn thuộc về hai chi *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringensis*, *B. amyloliquefaciens*) và *Acimernobacteri* [21]. Lại Thị Thuý Hiền và cs. (2013) đã thu nhận nhiều chủng thuộc chi *Bacillus* trong các mẫu trầm tích biển Việt Nam như: *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*... [22]. Như vậy, kết quả định danh một số chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này góp phần bổ sung vào cơ sở dữ liệu về thành phần các chi vi khuẩn phân lập từ vùng biển thuộc quần đảo Trường Sa, Việt Nam.

3.4. Đánh giá đa dạng vi khuẩn bằng kỹ thuật DGGE

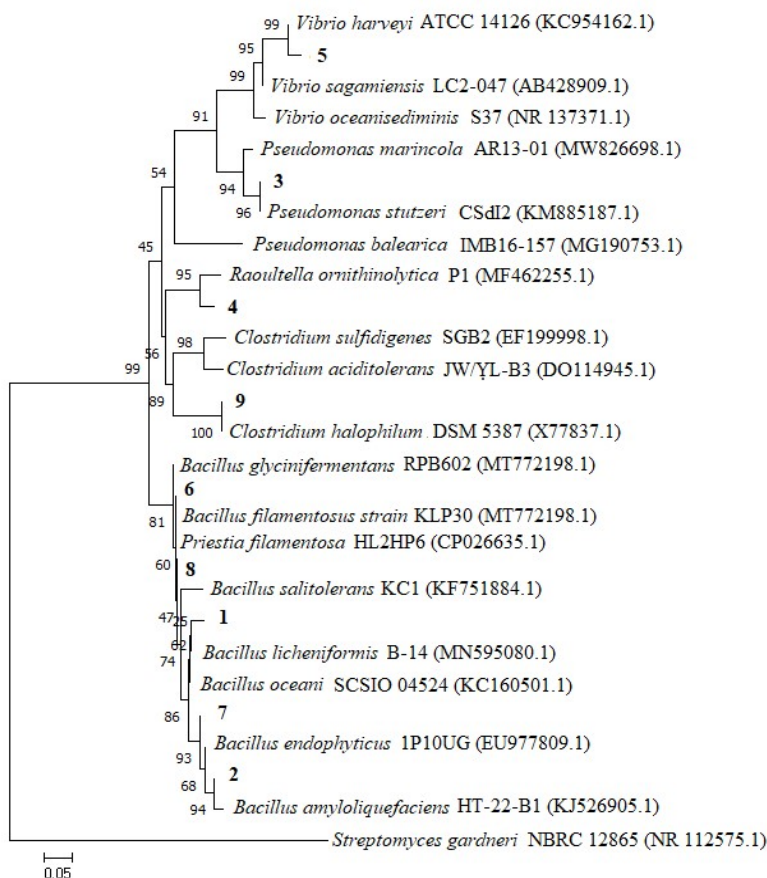
Tiến hành điện di biến tính DNA tổng số của 3 mẫu trầm tích thu được theo như đã mô tả. Có tổng số 9 vị trí băng khác nhau quan sát được trên hình ảnh điện di (hình 2). Trong đó, mẫu ĐL1020.01 (giếng 1) có 5 băng (từ 1 đến 5); mẫu ĐL1020.02 (giếng 2) có 3 băng (từ 7 đến 9); mẫu ĐL1020.03 (giếng 3) có 3 băng (băng 6, 8, 9). Theo nguyên lý của kỹ thuật DGGE, mỗi băng xuất hiện trên bản điện di có cùng kích thước và có trình tự sai khác nhau từ 1 đến vài nucleotide tương ứng với các loài khác nhau. Như vậy, xem xét tổng thể trên 3 mẫu trầm tích, phân tích PCR-DGGE thu được 9 băng khác nhau tương ứng với 9 loài vi khuẩn. Đồng thời, mẫu ĐL1020.01 có số băng nhiều nhất (5 băng), chứng tỏ đây là mẫu có đa dạng sinh học cao nhất, điều này cũng phù hợp với kết quả phân lập đã thu được. 05 băng trong mẫu ĐL1020.01 đều không xuất hiện trong mẫu ĐL1020.02 và ĐL1020.03, trong khi đó băng 8 và băng 9 lại xuất hiện trong cả 2 mẫu này. Kết quả này có thể là do sự khác biệt về độ sâu của trầm tích (2 m, 6 m, 8 m), cũng như khoảng cách từ vị trí lấy mẫu tới bờ (tăng dần theo độ sâu của mẫu được lấy) đã làm phân hóa hệ vi khuẩn tại đây. Sự sai khác cụ thể sẽ được làm sáng tỏ hơn sau khi tiến hành giải trình tự 9 băng DGGE.



Hình 2. Phân tích PCR-DGGE 16S rDNA của vi khuẩn trong trầm tích biển (Giếng 1 - ĐL1020.01; Giếng 2 - ĐL1020.02; Giếng 3 - ĐL1020.03)

Kết quả so sánh trình tự 9 đoạn gen tương ứng với 9 băng DGGE thu được cho thấy có độ tương đồng cao (> 98,91%) với 9 loài vi khuẩn khác nhau, và thuộc về các chi: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Vibrio*, *Priestia* và *Clostridium*. Trong

đó có 6 trình tự tương đồng cao với 6 loài thuộc về 3 chi (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Raoultella*) đã thu nhận được ở bước phân lập trước đó (các băng 1, 2, 3, 4, 6, 7), và 3 trình tự tương đồng cao với 3 loài thuộc về 3 chi chỉ thu nhận được bằng điện di biến tính gồm: *Vibrio proteolyticus* (băng 5), *Priestia filamentosa* (băng 8), *Clostridium halophilum* (băng 9). Chi *Vibrio* đã được xác định là chiếm ưu thế ở độ sâu 0 - 10 cm của trầm tích biển Vịnh Tokyo (Urakawa, 2008), trong khi chi *Priestia* được phân lập từ mẫu ven biển Veraval, Ấn Độ (Wagh, 2021) [23], [24]. Trong số các băng được định danh có 1 chủng (tương ứng băng số 9) tương đồng 100% với chủng *Clostridium halophilum* DSM 5387 - thuộc nhóm kỵ khí hoàn toàn. Fendrich và cs. (1990) đã thu nhận chủng *Clostridium halophilum* DSM 5387 từ trầm tích biển siêu kiềm được thanh trùng với một số đặc điểm được mô tả: thuộc nhóm vi khuẩn Gram (+), hình thành nội bào tử, sinh trưởng tối ưu ở 35°C, nồng độ muối lên tới 6,0% NaCl [23].



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại Neighbour joining dựa trên trình tự đoạn 16S rDNA của các băng DGGE và các loài gần gũi đã công bố trên GenBank. (Đơn vị = 0,05 K_{nuc} trong trình tự nucleotide. Các số hiển thị ở các vị trí phân nhánh là kết quả phân tích bootstrap đối với 1000 phép so sánh. (*Streptomyces gardneri* NBRC 12865 được chọn làm nhóm ngoài)

Có thể nói, kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp những dữ liệu đầu tiên về việc sử dụng kỹ thuật DGGE để đánh giá đa dạng vi khuẩn tại khu vực quần đảo Trường Sa. Dù phạm vi nghiên cứu còn hẹp (chỉ mới khu trú trên 3 mẫu trầm tích thu thập tại Đá Lát, quần đảo Trường Sa) nhưng kỹ thuật DGGE đã cho thấy tính khả thi và hiệu quả để xác định quần thể vi sinh vật trong các mẫu trầm tích. Căn cứ vào thông tin các loài có mặt trong mỗi mẫu nhưng chưa phân lập, là cơ sở để thiết lập các điều kiện và môi trường mới, phù hợp với đặc điểm của chúng để có thể thu nhận các tổ hợp vi khuẩn hữu ích hay các chủng vi khuẩn thuần khiết, đồng thời đây cũng là cơ sở cho việc định hướng bảo tồn cũng như khai thác, sử dụng bền vững nhóm vi sinh vật này trong tương lai.

4. KẾT LUẬN

- Tổng số 17 chủng vi khuẩn được phân lập từ 3 mẫu trầm tích tại Đá Lát thuộc quần đảo Trường Sa. Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc và tế bào, các chủng này được phân loại vào 6 nhóm hình thái khác nhau.

- Kết quả phân tích trình tự 16S rDNA đại diện các nhóm cho thấy chúng thuộc về các chi *Bacillus* (ĐL01.B01, ĐL01.B09, ĐL02.B02, ĐL03.B01), *Pseudomonas* (ĐL01.B07) và *Raoultella* (ĐL01.B05).

- Kỹ thuật DGGE đã ghi nhận thêm sự có mặt của 3 chi vi khuẩn: *Clostridium*, *Vibrio*, *Priestia* trong các mẫu trầm tích biển mà phương pháp nuôi cấy truyền thống chưa phân lập được.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu nằm trong khuôn khổ đề tài KCB-TS-05 “Nghiên cứu khu hệ vi sinh vật phân bố tại khu vực quần đảo Trường Sa có khả năng xử lý các chất thải hữu cơ gây ô nhiễm môi trường”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Uritskiy G. et al., *Applying genome-resolved metagenomics to deconvolute the halophilic microbiome*, Genes, 2020, **10**(3):220-236;
2. Vanwonderghem I. et al., *Coral reef microorganisms in a changing climate*, Science, 2020, **23**:1-15.
3. Dlouhy S. R. et al., *Detecting point mutations by denaturing-gradient gel electrophoresis*, In: Rapley R. (eds) The Nucleic Acid Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks Humana Press, Totowa, NJ, 2000, p. 705-716.
4. Fischer S. G. et al., *DNA fragments differing by single-base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, **80**:1579-1583.
5. Muyzer G. et al., *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*, Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**:695-700.

6. Yoshikazu K. et al., *Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments*, FEMS Microbiol Ecol., 2003, **46**(2):147-157.
7. David C. G., *The effect of an acute copper exposure on the diversity of a microbial community in North Sea sediments as revealed by DGGE analysis--the importance of the protocol*, Marine Pollution Bulletin, 2004, **49**(5-6):504-513.
8. Kim H. R. et al., *Diversity of Marine Microbes by PCR-DGGE*. Kor. Jour. Fish. Aqua. Scien, 2007, **40**(6):356-361.
9. Vu N. T., Le T. M., Duong A. T., *Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE*, International Journal of Food Microbiology, 2008, **128**(2):268-273.
10. Lai T. H. et al., *Microbial diversity in trace water of jet fuel in Vietnam*, AJSTD, **25**(2):303-312.
11. Nguyễn Thu Hoài, *Nghiên cứu vi sinh vật ứng dụng cho sản xuất biogas làm tăng hiệu suất trong điều kiện môi trường nước lợ và nước mặn*, Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Khoa học tự nhiên/ĐHQGHN, 2014.
12. Đỗ Mạnh Hào, Đỗ Công Thung, *Một số kết quả nghiên cứu khu hệ vi sinh vật quần đảo Trường Sa*, Tuyển tập hội nghị khoa học và công nghệ biển toàn quốc lần thứ V, NXB KH&CN, Hà Nội, 2011, tr. 68-74.
13. Widdel F., Bak F., *Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria*, In The prokaryotes, Springer, New York, 1992, 3352-3378.
14. Lane D. J., *16S/23S rRNA sequencing*. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors, Nucleic acid techniques in bacterial systematics, New York: Wiley, 1991, tr. 115-175.
15. Harald B. et al., *Actinomycetes from sediments in the trondheim fjord, norway: diversity and biological activity*, Mar Drugs., **6**(1):12-24.
16. Nguyễn Lâm Dũng và cs., *Vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, (Tái bản), 2010, tr. 39-50.
17. Zhou C. et al., *Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by mcrA analysis*, Microbiology Resources, 2011, **166**:27-35.
18. Lopez I. et al., *Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, Appl Environ Microbiol., 2003, **69**(11):6801-6807.
19. Takeshi W. et al., *DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil*, FEMS Microbiology letters, 2004, **232**:15-163.

20. Tatsuhiko H. et al., *Global diversity of microbial communities in marine sediment*, PNAS, 2020, **117**(44):27587-27597.
21. Phí Quyết Tiến và cs., *Tuyển chọn vi khuẩn biển có tiềm năng ứng dụng trong xử lý ao nuôi tôm và phế liệu tôm*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2012, **10**(3):571-579.
22. Lại Thúy Hiền và cs., *Nghiên cứu đa dạng vi sinh vật ở vịnh nổi tiếng Việt Nam bằng phương pháp sinh học phân tử hiện đại*, Kỷ yếu Hội nghị Quốc tế “Biển Đông 2012”, tr. 387-400.
23. Urakawa H. et al., *Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling*, Environmental Microbiology, 2000, **2**:542-554.
24. Wagh V.S. et al., *Priestia veravalensis sp. nov., isolated from coastal sample*. Arch Microbiol., 2021, **203**:4839-4845.
25. Fendrich C. et al., *Clostridium halophilum sp. nov. and C. litorale sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction*, Arch. Microbiol., 1990, **154**:127-132.

SUMMARY

STUDY OF BACTERIAL DIVERSITY IN MARINE SEDIMENTS IN TRUONG SA ARCHIPELAGO, VIET NAM BY TRADITIONAL CULTURE-DEPENDENT METHODS IN COMBINATION WITH DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE)

The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is an effective culture-independent technique for assessing diversity of microbial communities. In this study, the PCR-DGGE technique was applied for analyzing the diversity of bacterial communities in marine sediment in the Truong Sa archipelago (Spratly Islands), Vietnam, and a comparison with cultivable bacterial fraction was performed. Three sediment samples taken from different depths were used in the study. A total of 17 bacterial strains were isolated and divided into 6 groups based on their colony and cell morphologies. Comparative analyses of nearly full-length 16S rDNA sequences retrieved from six representative strains of these morphologically distinguished groups indicated that they were most closely related to *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus filamentosus*, *Bacillus endophyticus*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas balearica*, and *Raoultella ornithinolytica*. The PCR-DGGE analyses carried out with the three sediment samples showed relatively diverse bacterial communities with 9 distinct bands, 6 of which were related to the isolated representatives, whereas the other three were identified as *Vibrio proteolyticus*, *Priestia filamentosa*, and

Clostridium halophilum. Thus, by applying the PCR-DGGE technique, more thorough information on bacterial communities in the sediment of Truong Sa archipelago could be elucidated, providing useful information for further studies on the conservation and utilization of microbial resources in this ecosystem.

Keywords: *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), marine sediments, Truong Sa archipelago (Spratly Islands), Bacillus, Vibrio, Pseudomonas, Clostridium, kỹ thuật điện di biến tính, trầm tích biển, quần đảo Trường Sa.*

Nhận bài ngày 14 tháng 7 năm 2021

Phản biện xong ngày 07 tháng 10 năm 2021

Hoàn thiện ngày 03 tháng 10 năm 2021

⁽¹⁾ *Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*