

ĐÁNH GIÁ TÍNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN VI KHUẨN TÍCH LŨY POLYPHOSPHAT PHÂN LẬP TỪ TRONG NƯỚC AO NUÔI CÁ TRA VÀ CHẤT THẢI TRẠI CHĂN NUÔI HEO Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Lê Quang Khôi¹, Trương Trọng Ngôn² và Cao Ngọc Diệp²

¹ Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng và Dịch vụ Khoa học Công nghệ Tiền Giang

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 12/06/2013

Ngày chấp nhận: 30/10/2013

Title:

Genetic diversity analysis of polyphosphate accumulating bacteria isolated from water of catfish pond and piggery wastewater in the Mekong Delta, Vietnam

Từ khóa:

Ao nuôi cá tra, chất thải trại chăn nuôi heo, chỉ số đa dạng loài Shannon, chỉ số đồng đều Shannon, vi khuẩn tích lũy polyphosphat

Keywords:

Catfish pond, piggery wastewater, polyphosphate accumulating bacteria, Shannon diversity index, Shannon evenness index

ABSTRACT

Genetic diversity analysis of polyphosphate accumulating bacterial community isolated from water of catfish pond and piggery wastewater in the Mekong Delta, Vietnam was studied from August 2012 to April 2013. The results of Shannon-Weiner species diversity index (H') and Shannon Evenness index (J') shown that the H' indices among different classes highly varied from 0,301 to 0,797. This difference was mainly changed because of the total number of species and the species evenness for each class. The H' indices of polyphosphate accumulating bacterial community isolated from water of catfish pond and piggery wastewater were relatively high and similar ($H'=1,07$) although there was a difference in the total number of isolates. These results revealed that the H' indices of polyphosphate accumulating bacterial community from different niches were less dependent on the total number of isolates but more dependent on the composition of species, the total number of species and relative frequency of isolates in each species.

TÓM TẮT

Phân tích đánh giá tính đa dạng di truyền của quần thể vi khuẩn tích lũy polyphosphat phân lập từ nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long được thực hiện từ tháng 8/2012 đến tháng 4/2013. Kết quả phân tích chỉ số đa dạng loài Shannon (H') và chỉ số đồng đều Shannon (J') cho thấy giữa các lớp khác nhau thì chỉ số đa dạng loài H' có sự biến động lớn, dao động từ 0,301 đến 0,797. Sự khác biệt về chỉ số đa dạng loài trong các lớp chủ yếu là do sự biến động về tổng số loài xuất hiện trong mỗi lớp và độ đồng đều của chúng. Chỉ số đa dạng loài H' giữa hai quần thể vi khuẩn tích lũy polyphosphat trong nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo tương đối cao và giống nhau ($H'=1,07$), mặc dù tổng số dòng được phân lập là khác nhau. Điều này cho thấy rằng, trong các hệ sinh thái khác nhau sự đa dạng loài của vi khuẩn tích lũy polyphosphat ít phụ thuộc vào tổng số các dòng vi khuẩn được phân lập mà chủ yếu phụ thuộc nhiều vào thành phần loài, tổng số loài và tần số xuất hiện của từng dòng vi khuẩn trong mỗi loài.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn tích lũy polyphosphat (polyphosphate accumulating bacteria - PAB) là nhóm vi khuẩn có

vai trò quan trọng trong xử lý nước thải bằng con đường sinh học. Chúng tích lũy lượng lớn polyphosphat (poly-P) nội bào, góp phần vào quá

trình loại bỏ phospho hòa tan trong nước (Mino *et al.*, 1998). Hiện nay, việc áp dụng phương pháp phân lập truyền thống và kỹ thuật sinh học phân tử cho thấy quần thể PAB có sự đa dạng về thành phần loài, kể cả trong các hệ thống xử lý nước thải và trong các ao - hồ tự nhiên. Sự hiện diện của các giống loài và thành phần phần trăm các giống cũng có sự khác nhau giữa 2 hệ sinh thái: nhân tạo (hệ thống xử lý nước thải) và tự nhiên (ao - hồ). Tuy nhiên, chúng chủ yếu thuộc các lớp Bacilli, Actinobacteria, Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria (Crocetti *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2007). Tùy vào hệ sinh thái mà thành phần nào chiếm ưu thế, thường trong hệ thống xử lý nước thải có thành phần dinh dưỡng cao thì lớp Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobacteria và Actinobacteria được cho là các lớp có nhiều ưu thế nổi trội về thành phần và số lượng (Bond *et al.*, 1995, Beer *et al.*, 2006). Trong khi ở các ao hồ có thành phần dinh dưỡng ít hơn đặc biệt là nitơ và phospho, thì lớp Bacilli, Actinobacteria được nhận thấy là PAB chiếm ưu thế (Szabó *et al.*, 2011).

Đánh giá đa dạng sinh học của PAB là một nghiên cứu cần thiết nhằm tạo nên cơ sở dữ liệu cho các giải pháp bảo tồn, sử dụng bền vững nguồn vi khuẩn tích lũy polyphosphat bản địa có lợi trong tự nhiên. Đánh giá độ đa dạng sinh học của vi khuẩn tích lũy polyphosphat có thể diễn ra ở hai mức: loài và hệ sinh thái. Đa dạng loài được xem là sự đa dạng phong phú về loài trong một quần thể hay trong một tập hợp các cá thể. Đa dạng hệ sinh thái hay quần thể là đa dạng sinh học bao gồm những biến đổi trong các quần thể ở quy mô lớn hơn mà trong đó các loài trong các quần thể có thể tồn tại và tương tác qua lại với nhau và với môi trường. Khái niệm đánh giá đa dạng sinh học là phân tích định lượng các chỉ số đa dạng sinh học (biodiversity measurement: chỉ số đa dạng loài H' - Shannon - Weiner's index; chỉ số đồng đều J' - Shannon Evenness index).

Mục đích của nghiên cứu này dựa trên các dòng vi khuẩn tích lũy polyphosphat được phân lập từ nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo để phân tích tính đa dạng di truyền của chúng làm cơ sở cho việc đánh giá sự phân bố và tính di truyền quần thể của nhóm vi khuẩn quan trọng này.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn tích lũy polyphosphat sử

dụng để đánh giá sự đa dạng di truyền thu từ 22 dòng vi khuẩn phân lập từ nước ao nuôi cá tra (Khoi và Diep, 2013) và 26 dòng vi khuẩn phân lập từ chất thải trại chăn nuôi heo đã qua xử lý bằng biogaz (Lê Quang Khôi và Cao Ngọc Diệp, 2013) ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Trong 48 loài phân lập, 22 dòng phân lập từ nước ao nuôi cá tra nằm trong 4 lớp Bacilli, Actinobacteria, Gamma-proteobacteria và Beta-proteobacteria và 26 dòng phân lập trong chất thải trại chăn nuôi heo thuộc 4 lớp Bacilli, Actinobacteria, Gamma-proteobacteria và Alpha-proteobacteria được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: Thành phần và số lượng loài vi khuẩn tích lũy poly-P cao phân lập được trong nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo

Lớp/loài	Số lượng loài	
	Nước ao nuôi cá tra	Chất thải trại chăn nuôi heo
Gamma-proteobacteria	3	1
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1	-
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	-
Alpha-proteobacteria	0	5
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	1
<i>Ochrobactrum tritici</i>	-	2
<i>Xanthobacter flavus</i>	-	1
<i>Xanthobacter</i> sp.	-	1
Actinobacteria	5	5
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	1	-
<i>Arthrobacter</i> sp.	2	-
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	1	-
<i>Mycobacterium phocaicum</i>	1	-
<i>Corynebacterium</i> sp.	-	1
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	-	1
<i>Rhodococcus</i> sp.	-	3
Bacilli	12	15
<i>Bacillus aryabhatai</i>	3	5
<i>Bacillus barbaricus</i>	-	1
<i>Bacillus cereus</i>	-	2
<i>Bacillus ginsengihumi</i>	1	-
<i>Bacillus megaterium</i>	5	3
<i>Bacillus</i> sp.	2	3
<i>Bacillus subtilis</i>	-	1
<i>Kurthia</i> sp.	1	-
Beta-proteobacteria	2	0
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	1	-
<i>Cupriavidus</i> sp.	1	-
Tổng	22	26

2.2 Phương pháp đánh giá tính đa dạng di truyền

Chỉ số đa dạng sinh học loài H' (species diversity Shannon and Weiner's index, 1963): Định lượng chỉ số đa dạng sinh học là phép thống kê có sự tổ hợp của hai yếu tố là thành phần số lượng loài và khả năng xuất hiện của các cá thể trong mỗi loài. Chỉ số đa dạng H' không chỉ phụ thuộc vào thành phần loài, số loài mà cả số lượng cá thể và xác suất xuất hiện của các cá thể trong mỗi loài. Chỉ số H' được tính theo công thức (Richard, 2005)

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i / \ln(P_i)$$

Hoặc,

$$H' = - [P_1 \ln(P_1) + P_2 \ln(P_2) + P_3 \ln(P_3) + \dots + P_s \ln(P_s)]$$

H' : chỉ số đa dạng loài Shannon-Weiner

P_i : tần số xuất hiện của loài thứ i

S : tổng số loài

Chỉ số đồng đều Shannon (Shannon Evenness - J'): khảo sát tính phân bố đồng đều của các dòng vi khuẩn trong các loài. Chỉ số J' được tính dựa trên chỉ số đa dạng loài Shannon H' và H'_{max} (Richard, 2005).

$$J' = H' / H'_{max} \quad (J' \text{ có giá trị từ } 0 \text{ đến } 1)$$

$H'_{max} = \ln(S)$. H'_{max} là chỉ số đa dạng loài cực đại đạt được khi các dòng vi khuẩn có sự phân bố đồng đều giữa các loài với nhau. Nói cách khác, khi tần số xuất hiện của mỗi loài trong quần thể bằng nhau thì chỉ số đa dạng đạt giá trị cực đại.

S (Species Richness): là số loài vi khuẩn

Phân tích định lượng các chỉ số đa dạng sinh học Shannon H' và độ đồng đều Shannon J' bằng phần mềm Biodiversity Pro (Neil McAleece *et al.*, 1997).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự đa dạng loài giữa các lớp vi khuẩn tích lũy poly-P

Tính đa dạng loài giữa các lớp trong quần thể vi khuẩn tích lũy poly-P được phân lập trong nước ao nuôi cá tra và trại chăn nuôi heo được đánh giá qua các chỉ số đa dạng loài Shannon (H') và độ đồng đều Shannon (J') (Bảng 2). Chỉ số đa dạng loài giữa các lớp khác nhau dao động từ 0,301 đến 0,797. Tính đa dạng cao nhất thuộc về lớp Actinobacteria (10 dòng, chỉ số $H'=0,797$), kế đến là lớp Bacilli (27 dòng, chỉ số $H'=0,744$). Hai lớp có chỉ số H' trong khoảng trung bình là Alpha-

proteobacteria (5 dòng, chỉ số $H'=0,579$) và Gamma-proteobacteria (4 dòng, chỉ số $H'=0,452$). Lớp có sự đa dạng thấp nhất (Beta-proteobacteria) là lớp có số loài thấp nhất (2 dòng, chỉ số $H'=0,301$).

Bảng 2: Chỉ số đa dạng loài giữa các lớp trong quần thể vi khuẩn tích lũy poly-P phân lập

Lớp	Tổng số dòng	H'	J'
Bacilli	27	0,744	0,824
Actinobacteria	10	0,797	0,943
Alpha-proteobacteria	5	0,579	0,961
Beta-proteobacteria	2	0,301	1
Gamma-proteobacteria	4	0,452	0,946

Kết quả trên cho thấy, tính đa dạng loài giữa các lớp không chỉ phụ thuộc vào tổng số dòng vi khuẩn phân lập trong mỗi lớp mà còn phụ thuộc nhiều vào tần số xuất hiện của mỗi loài trong lớp. Tần số xuất hiện của mỗi loài được thể hiện qua chỉ số đồng đều Shannon (J'). Chỉ số J' có giá trị từ 0 đến 1. Trong một lớp nếu tất cả các loài đại diện xuất hiện với tần số như nhau thì chỉ số J' tiến về 1 ($J'=1$) cho thấy H' sẽ bằng H'_{max} . Kết quả phân tích cho thấy, mặc dù lớp Bacilli có tổng số dòng cao nhất (27 dòng) nhưng chỉ số đa dạng loài ($H'=0,744$) thấp hơn với lớp Actinobacteria (10 dòng, $H'=0,797$). Điều này chứng tỏ rằng tần số xuất hiện các loài đại diện cho lớp Actinobacteria ($J'=0,943$) đồng đều hơn trong lớp Bacilli ($J'=0,824$). Kết quả cũng cho thấy tần số xuất hiện các loài thuộc lớp Bacilli có sự chênh lệch cao (*Bacillus aryabhatai*, 8 lần xuất hiện; *Bacillus megaterium*, 8 lần xuất hiện; *Bacillus sp.*, 5 lần xuất hiện) hơn trong lớp Actinobacteria (chỉ có dòng *Rhodococcus sp.* 3 lần xuất hiện) (Bảng 1). Số dòng trong cùng loài có sự lặp lại cao và tần số xuất hiện của các loài khác biệt dẫn đến chỉ số J' thấp và điều này làm giảm đi tính đa dạng loài trong lớp Bacilli.

So sánh tính đa dạng loài giữa các lớp ở hai vùng sinh thái là ao nuôi cá tra và trại chăn nuôi heo. Bảng 3 cho thấy có sự khác biệt về thành phần loài giữa các lớp trong hai quần thể vi khuẩn. Quần thể vi khuẩn trong nước ao nuôi cá tra thì không tìm thấy có sự hiện diện trong lớp Alpha-proteobacteria, nhưng ở quần thể vi khuẩn được phân lập trong chất thải trại chăn nuôi heo thì có và chúng chiếm tỉ lệ tương đối cao (5/26 dòng, chiếm 19,2%). Ngược lại, trong chất thải trại chăn nuôi heo thì không tìm thấy được các vi khuẩn trong lớp Beta-proteobacteria có khả năng tích lũy

polyphosphat cao, nhưng ở nước ao cá tra thì có sự hiện diện của chúng. Điều này cho thấy sự xuất hiện các giống loài vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-P cao nằm trong hai lớp Alpha- và Beta-

proteobacteria phụ thuộc nhiều vào đặc tính của từng chất thải và điều này được chứng minh bởi nghiên cứu của Szabó *et al.* (2011) và Bond *et al.* (1995).

Bảng 3: Biến động chỉ số H' và J giữa các lớp vi khuẩn trong nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo

Lớp	Nước ao nuôi cá tra			Chất thải chăn nuôi heo		
	Tổng số dòng	H'	J'	Tổng số dòng	H'	J'
Bacilli	12	0,618	0,885	15	0,727	0,934
Actinobacteria	5	0,579	0,961	5	0,413	0,865
Beta-proteobacteria	2	0,301	1	-	-	-
Gamma-proteobacteria	3	0,477	1	1	0,301	1
Alpha-proteobacteria	-	-	-	5	0,579	0,961

Ở các lớp còn lại, chỉ số đa dạng loài giữa hai quần thể vi khuẩn nằm trong các lớp Bacilli, Actinobacteria và Gamma-proteobacteria cũng có sự biến động (Bảng 3). Sự khác nhau giữa chỉ số H' trong cùng một lớp ở hai đối tượng nghiên cứu là do sự khác nhau về tổng số dòng phân lập được và độ đồng đều (J) như trong lớp Bacilli và Gamma-proteobacteria. Ở lớp Actinobacteria, mặc dù số dòng vi khuẩn phân lập từ nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo là giống nhau (5 dòng) nhưng chỉ số đồng đều (J) là khác nhau dẫn đến độ đa dạng loài khác nhau. Kết quả phân tích này cho thấy rằng thành phần và tính chất của từng loại chất thải (nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo) quyết định về thành phần loài và tính đa dạng loài trong mỗi lớp vi khuẩn phân lập.

3.2 Sự đa dạng loài giữa hai quần thể vi khuẩn tích lũy poly-P phân lập từ nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo

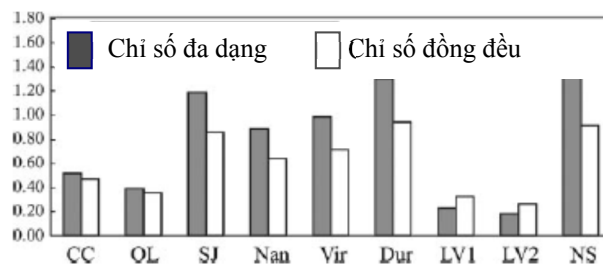
So sánh tính đa dạng loài giữa hai quần thể vi khuẩn tích lũy poly-P được phân lập từ hai vùng sinh thái khác nhau là nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo. Bảng 4 cho thấy, tổng số dòng vi khuẩn phân lập có khả năng tích lũy poly-P cao thì khác nhau giữa hai vùng sinh thái nhưng chỉ số đa dạng (H') giống nhau. Điều này cho thấy rằng, mặc dù số lượng quần thể vi khuẩn phân lập trong chất thải trại chăn nuôi heo cao hơn trong

nước ao nuôi cá tra, nhưng số dòng vi khuẩn trong cùng loài có sự lặp lại cao và điều này không làm tăng tính đa dạng loài trong quần thể. Kết quả nghiên cứu này cho thấy rằng trong các hệ sinh thái khác nhau, chỉ số đa dạng loài ít phụ thuộc vào tổng số lượng vi khuẩn hiện hữu mà chủ yếu phụ thuộc nhiều vào thành phần loài, số loài và tần số xuất hiện của từng dòng vi khuẩn riêng rẽ trong mỗi loài.

Bảng 4: Chỉ số H' và J của 2 quần thể vi khuẩn tích lũy poly-P trong nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo

Địa điểm thu mẫu	Tổng số dòng vi khuẩn	H'	J'
Ao nuôi cá tra	22	1,07	0,933
Chất thải trại nuôi heo	26	1,07	0,928

Nhìn chung chỉ số đa dạng loài (H') giữa hai quần thể vi khuẩn tích lũy poly-P trong nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo tương đối cao [H'=1,07; (Bảng 4)]. Kết quả này có sự tương đồng với nghiên cứu của He *et al.* (2007) khi nghiên cứu sự đa dạng vi khuẩn tích lũy poly-P trong các hệ thống xử lý nước thải ở Hoa Kỳ, có chỉ số đa dạng loài Shannon H' dao động từ 0,2 đến 1,45 và chỉ số độ đồng đều J biến thiên từ 0,25 đến 0,95 (Hình 1).



Hình 1: Chỉ số đa dạng Shanon (H') và chỉ số đồng đều (J) của quần thể vi khuẩn tích lũy polyphosphat trong các hệ thống xử lý nước thải (He *et al.*, 2007)

4 KẾT LUẬN

Các dòng vi khuẩn tích lũy poly-P phân lập được thể hiện sự phong phú và sự đa dạng tương đối cao. Bacilli là lớp có thành phần vi khuẩn chiếm ưu thế cho cả hai quần thể vi khuẩn tích lũy poly-P phân lập được trong nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo. Kết quả phân tích chỉ số đa dạng Shannon (H') và chỉ số đồng đều Shannon (J) cho thấy tính đa dạng loài của vi khuẩn tích lũy poly-P chủ yếu phụ thuộc vào thành phần loài, tổng số loài và tần số xuất hiện của loài trong quần thể. Bên cạnh đó, tính đa dạng loài của vi khuẩn tích lũy poly-P giữa các lớp vi khuẩn thì khác nhau, nhưng lại giống nhau giữa hai quần thể vi khuẩn được phân lập trong hai vùng sinh thái khác nhau là nước ao nuôi cá tra và chất thải trại chăn nuôi heo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahn J., S. Schroeder, M. Beer, S. Mcllroy, R. C. Bayly, J. W. May, G. Vasiliadis and R. J. Seviour. 2007. Ecology of the Microbial Community removing Phosphate from Wastewater under Continuously Aerobic Conditions in a Sequencing Batch Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp. 2257 - 2270.
- Beer M., H. M. Stratton, P. C. Griffiths and R. J. Seviour. 2006. Which are the polyphosphate accumulating organisms in full scale activated sludge enhanced biological phosphate removal system in Australia?. *Applied of Microbiology*, 100, pp. 233-243.
- Bond P. L., P. Hugenholtz, J. Keller And L. L. Blackall. 1995. Bacterial community structure of phosphate removing and non-phosphate removing activated sludges from sequencing batch reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), pp. 1910-1916.
- Crocetti G. R., P. Hugenholtz, P. L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins, and L. L. Blackall. 2000. Identification of Poly-P-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), pp. 1175-1182.
- He S., D. L. Gall, and K. D. McMahon. 2007. "Candidatus Accumulibacter" Population Structure in Enhanced Biological Phosphorus Removal Sludges as Revealed by Poly-P Kinase Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp. 5865 - 5874.
- Khoi L. Q and C. N. Diep. 2013. Isolation and phylogenetic analysis of polyphosphate accumulating organisms in water and sludge of intensive catfish ponds in the Mekong Delta, Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, vol. 1(2), pp. 61-71.
- Lê Quang Khôi và Cao Ngọc Điệp. 2013. Phân lập và phân tích sự đa dạng vi khuẩn tích lũy polyphosphat trong chất thải trại chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 10(2), pp. 58-67.
- Mino, T., M. C. M. Van Loosdrecht and J. J. Heijnen. 1998. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* 32, pp. 3193-3207.
- Neil McAleece, P. J. D. Lamshead and G. L. J. Paterson. 1997. Biodiversity Pro.: Free Statistics Software for Ecology. The Natural History Museum, London.
- Richard L. Boyce. 2005. Teaching issues and Experiments in Ecology (TIEE) - Committee of the Ecology Society of American. *Ecological Society of American*. Vol. 3, pp. 10-15.
- Shannon, C. E. and W. Weiner. 1963. The mathematical theory of communities. Illinois: Urbana University, Illinois Press.
- Szabó G., B. Khayer, A. Rusznyák, I. Tátrai, G. Dévai, K. Márialigeti and A K. Borsodi. 2011. Seasonal and spatial variability of sediment bacterial communities inhabiting the large shallow Lake Balaton. *Hydrobiologia*, 663, pp. 217-232.