

PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VI KHUẨN SỐNG TRONG CANH TRÙNG NUÔI TẢO *Chlorella* KHÔNG THUẦN KHIẾT

Vũ Thị Hoàn

Khoa Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Tác giả liên hệ: hoanvt@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 06.02.2018

Ngày chấp nhận: 06.09.2018

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm tìm ra được sự đa dạng các loài vi khuẩn sống cùng với tảo *Chlorella*. Chúng tôi đã sử dụng môi trường bán rắn Nutrient Broth với nồng độ pha loãng 10 và 100 lần để phân lập vi khuẩn từ hai canh trùng (môi trường) nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C2 và C6, có nguồn gốc từ đất. Để định danh vi khuẩn phân lập được đến tên giống, chúng tôi tiến hành giải trình tự, so sánh sự giống nhau về trình tự của hầu hết chiều dài gen 16S rRNA của chúng với những loài gần nhất trên genbank/ncbi và xây dựng cây phả hệ cho từng giống (genus). Mười sáu chủng vi khuẩn đã được phân lập và định danh thuộc về 7 giống như sau: *Caulobacter*, *Shinella*, *Aminobacter*, *Variovorax*, *Polaromonas*, *Brevundimonas*, *Emticicia*. Nghiên cứu này cho thấy sự phong phú, đa dạng các loài vi khuẩn sống trong canh trùng nuôi tảo không thuần khiết.

Từ khóa: *Chlorella*, định danh vi khuẩn, phân lập vi khuẩn; vi khuẩn sống chung với tảo.

Isolation and Identification of Bacteria Co-Cultivated with Non-Axenic Cultures of *Chlorella*

ABSTRACT

This study was investigated to find out the diversity of bacteria co-cultivated with microalgae *Chlorella*. Bacteria were isolated from two non-axenic algal cultures of *Chlorella* sp. strains C2 and C6 originated from soil using agar plates of 10- and 10²-fold diluted nutrient broth. Based on the similarity of the almost full length 16S rRNA gene sequences, the type strains of species phylogenetically closely related to the isolated strains and neighbor-joining tree, the strains were identified at the genus level. Sixteen bacterial strains were isolated and identified as species of seven genera as follows: *Caulobacter*, *Shinella*, *Aminobacter*, *Variovorax*, *Polaromonas*, *Brevundimonas*, *Emticicia*. The study showed the diversity and abundance of bacteria co-cultivated with non-axenic cultures of algae.

Keywords: Bacteria co-cultivated with algae; *Chlorella*, bacterial isolation, identification.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi sinh vật giữ một vai trò vô cùng quan trọng trong các vòng tuần hoàn vật chất trên trái đất, đặc biệt là quá trình trao đổi năng lượng cũng như tuần hoàn sinh hóa các nguyên tố của hệ sinh thái. Trong tự nhiên, vi sinh vật được biết đến với rất nhiều dạng chung sống, thể hiện qua các mối quan hệ từ cạnh tranh, tương hỗ... cho đến cộng sinh (Cole, 1982). Trong hệ sinh thái đất, mối quan quan hệ giữa vi

khẩn và thực vật đã có rất nhiều những nghiên cứu, đặc biệt là vi khuẩn vùng rễ (rhizosphere), vùng đất nơi mà vi khuẩn sinh trưởng và phát triển dựa vào hoạt động của rễ cây. Khái niệm “phycosphere” tương đồng với vùng rễ, là vùng xung quanh tế bào tảo, nơi chứa các sản phẩm trao đổi chất, chủ yếu là các hợp chất hữu cơ, trở thành nguồn dinh dưỡng cung cấp cho các vi sinh vật khác sinh sống. Một lượng không nhỏ các loại tảo sinh sống trong đất và vùng “phycosphere”, là nơi sinh sống rất tốt cho các

loại vi khuẩn (Bell & Mitchell, 1972). Nghiên cứu về mối quan hệ giữa vi khuẩn và tảo lục (ngành tảo lục - *Chlorophyta*) có ý nghĩa rất lớn bởi vì nó không chỉ thể hiện mối quan hệ cùng sinh sống giữa vi sinh vật với vi sinh vật mà còn là tiền đề của mối quan hệ giữa thực vật với vi sinh vật. Tuy nhiên, cho đến nay chúng ta có rất ít những nghiên cứu về những mối quan hệ này, đặc biệt là kiến thức về những loài vi khuẩn sống xung quanh/trên tế bào tảo cũng như ý nghĩa của sự cùng tồn tại này. Thực tế có một số loài tảo khi phân lập rất khó có thể làm sạch vi khuẩn (làm thuần khiết) và các nhà nghiên cứu thường nuôi duy trì tảo chung với vi khuẩn (Watanabe *et al.*, 2005).

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng hai canh trùng (môi trường) nuôi tảo là *Chlorella* sp. chủng C2 và chủng C6, là những loài tảo được phân lập từ đất nhưng không được làm thuần khiết, với mục đích giữ lại những loài vi khuẩn sống cùng với chúng để nghiên cứu về mối quan hệ giữa tảo lục và vi khuẩn. *Chlorella* sp. C2 và C6 là hai loài tảo lục, có hình cầu, không có tiên mao, kích thước dao động từ 5-8 μm , sinh bào tử. Việc phân lập vi khuẩn từ hai canh trùng nuôi tảo trên được tiến hành lần đầu tiên tại nghiên cứu này. Thành phần các loài vi khuẩn phân lập được sẽ được định danh để tìm ra được sự đa dạng sinh học trong mối quan hệ giữa tảo và vi khuẩn, làm tiền đề cho những nghiên cứu về vai trò của các cá thể cũng như chia khóa mở ra sự hiểu biết về mối quan hệ này nói riêng, mối quan hệ giữa vi sinh vật và thực vật nói chung.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Canh trùng nuôi tảo

Vi tảo lục *Chlorella* sp. C2 và *Chlorella* sp. C6 được phân lập từ đất tại khu thí nghiệm của Trường đại học Tokyo (Otsuka *et al.*, 2008). Chúng được nuôi ở trạng thái không thuần khiết (lẫn tạp vi khuẩn) trong thời gian dài phục vụ các mục đích nghiên cứu khác nhau. Chúng tôi sử dụng môi trường dinh dưỡng C dạng lỏng (Ichimura, 1971) để nuôi cấy hai chủng tảo *Chlorella* này. Tảo được nuôi ở điều

kiện sáng/tối luân phiên với 16 h sáng/8 h tối; cường độ chiếu sáng 10-20 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ và ở 25°C trong điều kiện sáng, 20°C trong điều kiện tối. Các chủng tảo này được cấy chuyển duy trì 4 tuần 1 lần. Toàn bộ thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện vô trùng tại phòng thí nghiệm khoa học đất, Trường đại học Tokyo, Nhật Bản.

2.2. Phân lập vi khuẩn

Dịch nuôi cấy sau 4 tuần của tảo *Chlorella* sp. chủng C2 và C6 được pha loãng đến nồng độ 10^{-4} và 10^{-5} bằng nước vô trùng và dùng nó để phân lập vi khuẩn như sau: cấy 100 μl canh dịch ở hai nồng độ pha loãng 10^{-4} và 10^{-5} trên đĩa thạch có chứa môi trường Nutrient Broth (NB) (Difco, Detroit, MI, US) đã pha loãng 10 và 100 lần (1/10 và 1/100 NB) với 3 lần lặp lại, sau đó đem nuôi ở 26°C trong 2 tháng. Trong quá trình nuôi, sự hình thành khuẩn lạc của vi khuẩn được kiểm tra và đếm mỗi tuần, sau 1 đến 2 tháng tiến hành phân lập tất cả các loại vi khuẩn có trên từng đĩa thạch dựa trên sự khác nhau về hình thái, kích thước, màu sắc,... của khuẩn lạc với từ 2 đến 3 khuẩn lạc cho một loại. Vi khuẩn sau đó được làm thuần bằng cách cấy truyền nhiều lần trên môi trường 1/10 NB và 1/100 NB. Những chủng vi khuẩn thuần khiết thu được tiếp tục được nuôi và giữ giống bằng cách cấy chuyển 4 tuần 1 lần trên môi trường 1/10 NB (dựa trên kết quả thí nghiệm cho thấy tất cả các loài vi khuẩn phân lập được ở môi trường 1/100 NB đều sinh trưởng phát triển tốt khi nuôi ở môi trường 1/10 NB). Vi khuẩn được nuôi ở 26°C trong 1 tuần và giữ ở 4°C trong 3 tuần. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện vô trùng.

2.3. Định danh vi khuẩn

2.3.1. Tách chiết DNA của vi khuẩn

Sử dụng que cấy vô trùng lấy từ 1 đến 5 khuẩn lạc của mỗi loại vi khuẩn sau 1 tuần nuôi cấy (số lượng khuẩn lạc phụ thuộc vào kích thước của nó) hòa vào 100 μl dung dịch 0,05 M, NaOH cho vào máy ổn nhiệt làm nóng ở 95°C trong 15 phút, sau đó ly tâm với tốc độ 15.000 vòng/phút trong khoảng 5-15 phút ở 4°C. Thu phần nổi

(DNA) và pha loãng 10 lần, sử dụng máy quang phổ UV để đo nồng độ cũng như kiểm tra sự tinh sạch của DNA tách chiết được. Những DNA đạt tiêu chuẩn được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng khuếch đại gen tiếp theo.

2.3.2. Phản ứng khuếch đại (PCR-Polymerase chain reaction) gen 16S ribosomal RNA

Hầu hết chiều dài đoạn gen 16S ribosomal RNA (rRNA) (xấp xỉ 1500 bp) của những loài vi khuẩn trên được khuếch đại bởi phản ứng PCR với việc sử dụng cặp mồi xuôi 27F và ngược 1492R tương ứng với vị trí 8-27 và 1492-1513 ở gen 16S rRNA của vi khuẩn *Escherichia coli* 16S rRNA (trình tự gen của mồi được trình bày tại bảng 2).

Phản ứng PCR được thực hiện trong điều kiện như sau: Sử dụng ống PCR vô trùng 0,2 ml chứa 25 µl hỗn hợp phản ứng bao gồm: 1 µl DNA mẫu được chiết xuất từ mỗi chủng vi khuẩn phân lập được; 0,5 µl cho lần lượt mồi 27 F và 1492R với nồng độ 10 pM; 2,5 µl 50 mM MgCl₂; 17,4 µl nước MilliQ; 0,1 µl enzyme AmpliTaq DNA (Applied Biosystems); 0,5 µl dNTP (2,5 mM cho mỗi loại NTP); 2,5 µl BSA (nồng độ 5 mg/ml). Quy trình chạy PCR bao gồm: 1 chu kỳ nhiệt 94°C trong 10 phút nhằm làm biến tính đoạn DNA, sau đó là 27 chu kỳ nhiệt với 3 bước: (1) biến tính - tách sợi DNA ở 94°C trong 30 giây, (2) gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, (3) tổng hợp - kéo dài ở 72°C trong 1 phút. Quá trình chạy phản ứng PCR hoàn thành ở điều kiện 72°C trong 7 phút, sản phẩm cuối cùng của

phản ứng được giữ ở 4°C. Quy trình PCR được thực hiện trên máy chu kỳ nhiệt GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, US), kích thước (chiều dài) đoạn gen là sản phẩm của quá trình khuếch đại gen bằng phương pháp PCR được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel 1,5% agarose nhuộm bằng ethidium bromide.

2.3.3. Giải trình tự gen 16S rRNA và định danh vi khuẩn

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng cột MicroSpin S-400 HR (GE Healthcare Biosciences, Oslo, Norway) được sử dụng trực tiếp làm khuôn mẫu cho việc giải trình tự gen với việc dùng các cặp mồi xuôi (F) và ngược (R) theo thứ tự bao gồm: 27F, 533F, 926F, 520R, 951R, và 1492R (Bảng 1) và chạy trên máy CEQ 8000 (Beckman Coulter). Kết quả giải trình tự gen được phân tích và hiệu chỉnh bằng phần mềm Finch TV 1.4 (Geospiza, Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com/finchtv/>). Sau khi loại bỏ trình tự các đoạn mồi, tiến hành hiệu chỉnh trình tự hai chiều của gen bằng phần mềm Clustal W 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) để thu được chính xác trình tự gen 16S rRNA của từng chủng vi khuẩn phân lập được.

Chúng tôi đã sử dụng chương trình SeqMatch program (Cole *et al.*, 2007) để so sánh sự tương đồng về trình tự hầu hết chiều dài gen 16S rRNA của những chủng loài vi khuẩn có quan hệ gần gũi nhất với những chủng vi khuẩn phân lập được. Sử dụng phần mềm Clustal W 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) để phân tích sự phát

Bảng 1. Trình tự các đoạn mồi sử dụng khuếch đại và giải trình tự gen 16S rRNA

Primer	Gen mục tiêu/(vị trí) ¹	Trình tự (5'-3')
27F	16S rDNA (8-27)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
533F	16S rDNA (515-533)	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA
926F	16S rDNA (907-926)	AAACTCAAATGAATTGACGG
520R	16S rDNA (538-520)	GTATTACCGCGGCTGCTGG
951R	16S rDNA (969-951)	TTGCATCGAATTAACCAC
1492R	16S rDNA (1510-1492)	GGTTACCTTGTTACGACTT

Ghi chú: ¹Vị trí tương ứng với gen 16S rRNA ở vi khuẩn *Escherichia coli*.

sinh chủng loài của các chủng phân lập được và những chủng tương đồng để định danh vi khuẩn ở mức phân loại đến giống/loài.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Mật độ vi khuẩn

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy số lượng khuẩn lạc đếm được ở môi trường 1/10 NB và canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. loài C2 nhiều hơn ở môi trường 1/100 NB và canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. loài C6, tuy nhiên sự khác biệt này là không nhiều. Dựa vào sự khác nhau về hình thái, màu sắc, thời gian mọc... của các khuẩn lạc, chúng tôi đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C2, với ký hiệu là C2a1, C2a2, c2a3, C2b, C2b1, C2d, C2e và C2f và 8 chủng từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C6 với các ký hiệu tương ứng: C6a, C6a1, C6b, C6b1, C6d, C6d1, C6b2 và C6g (tổng cộng 16 chủng). Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được từ môi trường 1/100 NB đều sinh trưởng và phát triển tốt khi được nuôi cấy trên môi trường 1/10 NB, nhiều chủng thậm chí còn mọc nhanh hơn. Vì vậy, chúng tôi chỉ sử dụng duy nhất môi trường 1/10 NB để giữ giống vi khuẩn phân lập được cũng như dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả trên cho thấy sự phong phú, đa dạng về các loài vi khuẩn sống trong canh trùng

nuôi tảo và sự tồn tại những mối quan hệ nhất định giữa các loài vi sinh vật với nhau. Kết quả này mở ra những nghiên cứu tiếp theo như việc xác định vai trò của từng nhân tố trong sự kết hợp này; chất dinh dưỡng gì tảo cung cấp cho vi khuẩn và ngược lại vi khuẩn tạo ra chất gì để nuôi tảo? Trong môi trường nuôi tảo không có các hợp chất carbon, vậy rất có thể tảo đã tổng hợp và cung cấp cho vi khuẩn. Ngoài ra, chúng ta cần tìm thêm những chìa khóa khác để mở rộng hiểu biết về mối quan hệ này và những mối quan hệ khác nữa.

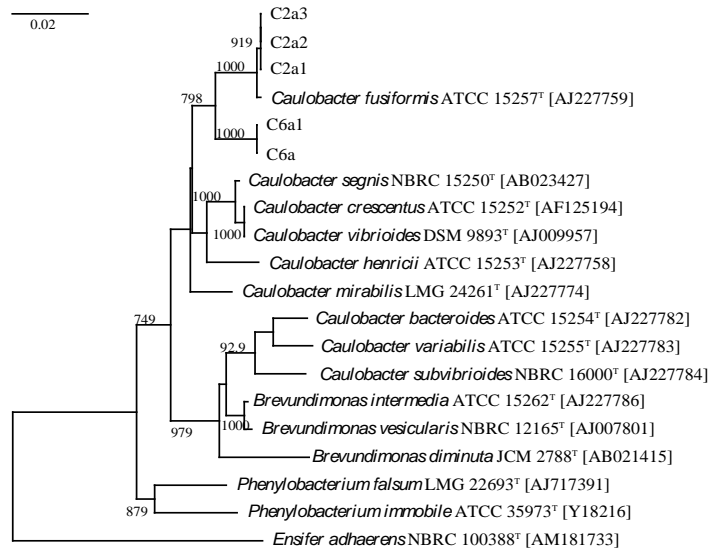
3.2. Định danh vi khuẩn

Các chủng C2a1, C2a2, C2a3, C6a1 và C6a2 được phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. C2 và C6, với đặc điểm khuẩn lạc có màu vàng nhạt, hình tròn, kích thước nhỏ, bề mặt trơn, nhày, lồi, thuộc kiểu khuẩn lạc dạng S. Kết quả phân tích trình tự gen cho thấy các chủng vi khuẩn C2a1, C2a2, C2a3 có trình tự gen 16S rRNA giống với loài gần nhất *Caulobacter fusiformis* ATCC 15257^T từ 99,7% đến 99,8%. Dựa vào kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loài (Hình 1) và sự giống nhau về trình tự gen 16S rRNA, chủng C2a1, C2a2, và C2a3 được định danh là *C. fusiformis*. Loài gần nhất với chủng C6a1 và C6a2 cũng là *C. fusiformis* ATCC 15257^T nhưng sự giống nhau về trình tự gen 16S rRNA thấp hơn, chỉ là 97,5%

Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn từ hai canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. C2 và C6

Ký hiệu	Nguồn gốc phân lập	Đặc điểm khuẩn lạc	Loài vi khuẩn gần nhất	Tỷ lệ giống về trình tự gen 16SrRNA (%)
C2a1 C2a2, c2a3	<i>Chlorella</i> sp. C2	Vàng nhạt, tròn, nhỏ, trơn, nhày, lồi	<i>Caulobacter fusiformis</i>	99,7-99,8
C6a, C6a1	<i>Chlorella</i> sp. C6			97,5-97,6
C6b1	<i>Chlorella</i> sp. C6	Trắng, tròn, có viền sáng huỳnh quang, không ướt, phẳng đến lồi, bề mặt trơn	<i>Shinella zoogloeoides</i>	98,5
C6b, C6g	<i>Chlorella</i> sp. C6	Trắng đến hơi vàng, tròn, hơi lồi, viền khô	<i>Aminobacter aminovorans</i>	99,9
C6d, C6d1, C6b2	<i>Chlorella</i> sp. C6	Trắng đục, tròn, ướt, lồi	<i>Variovorax limosa</i>	97,2-97,7
C2d, C2f	<i>Chlorella</i> sp. C2	Trắng đục, tròn, hơi lồi	<i>Polaromonas jejuensis</i>	97,6-97,9
C2e1	<i>Chlorella</i> sp. C2	Trắng trong, tròn, trơn láng, hơi lồi	<i>Brevundimonas kwangchunensis</i>	98,5
C2b, C2b1	<i>Chlorella</i> sp. C2	Hồng nhạt, tròn, trơn, hơi lồi	<i>Emticicia ginsengisoli</i>	99,0-99,4

Phân lập, định danh vi khuẩn sống trong canh trùng nuôi tảo *Chlorella* không thuần khiết

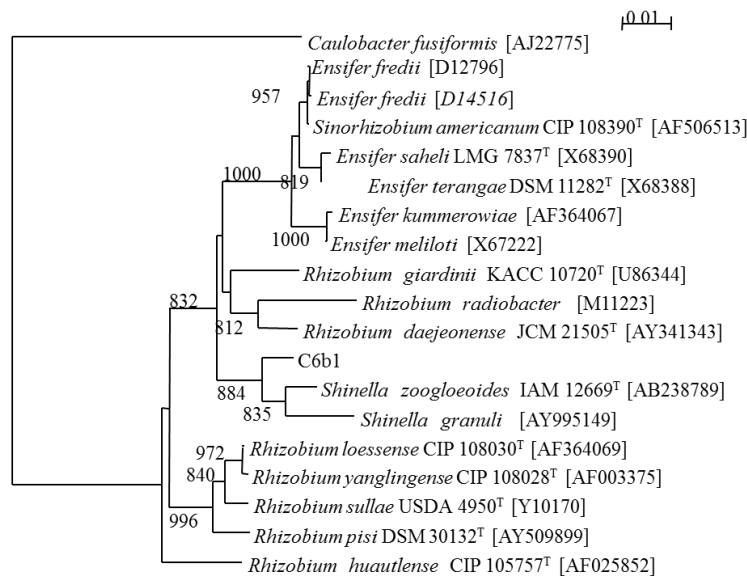


Ghi chú: Những số ở giao điểm thể hiện tần số xuất hiện của một nhóm

Hình 1. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự hầu hết chiều dài của gen16S rRNA của 5 chủng vi khuẩn, C2a1, C2a2, C2a3, C6a và C6a1 được phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C2 và C6

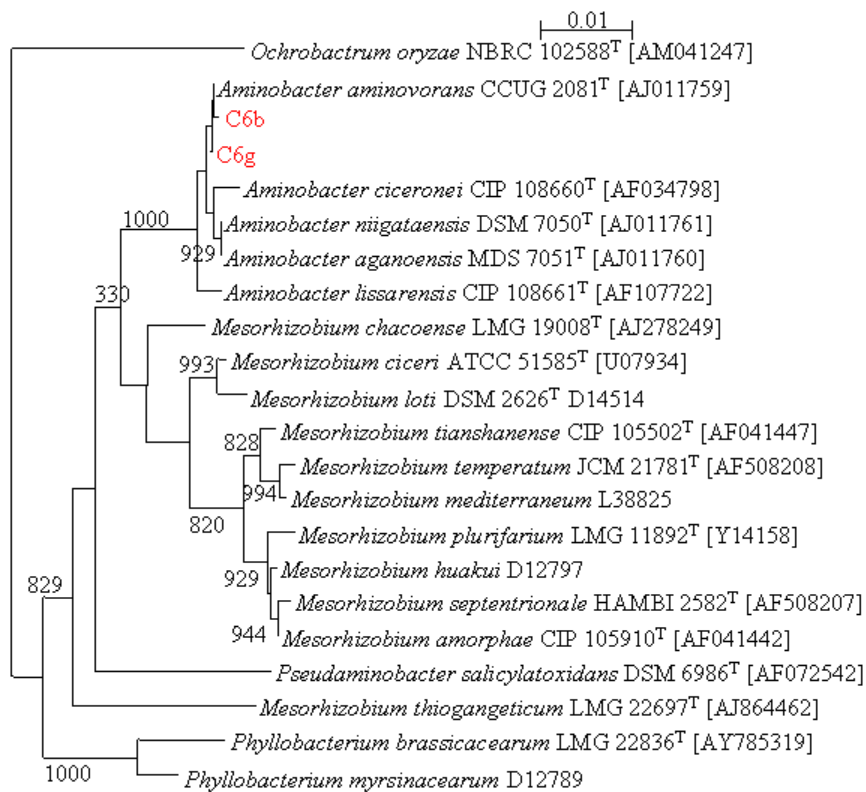
và 97,6%, cùng với kết quả thể hiện ở cây phả hệ (Hình 1) thì chúng được định danh thuộc giống *Caulobacter*, nhưng chưa xác định tên loài. Rất có thể hai chủng này là loài mới tìm được tại

nghiên cứu này, vì vậy cần có những nghiên cứu tiếp theo để chứng minh cho nhận định này, chúng tôi tạm định danh cho chúng là *Caulobacter* sp. C6a1 và C6a2.



Ghi chú: Những số ở giao điểm thể hiện tần số xuất hiện của một nhóm

Hình 2. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự hầu hết chiều dài của gen16S rRNA của chủng vi khuẩn C6b1 được phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C6



Ghi chú: Những số ở giao điểm thể hiện tần số xuất hiện của một nhóm

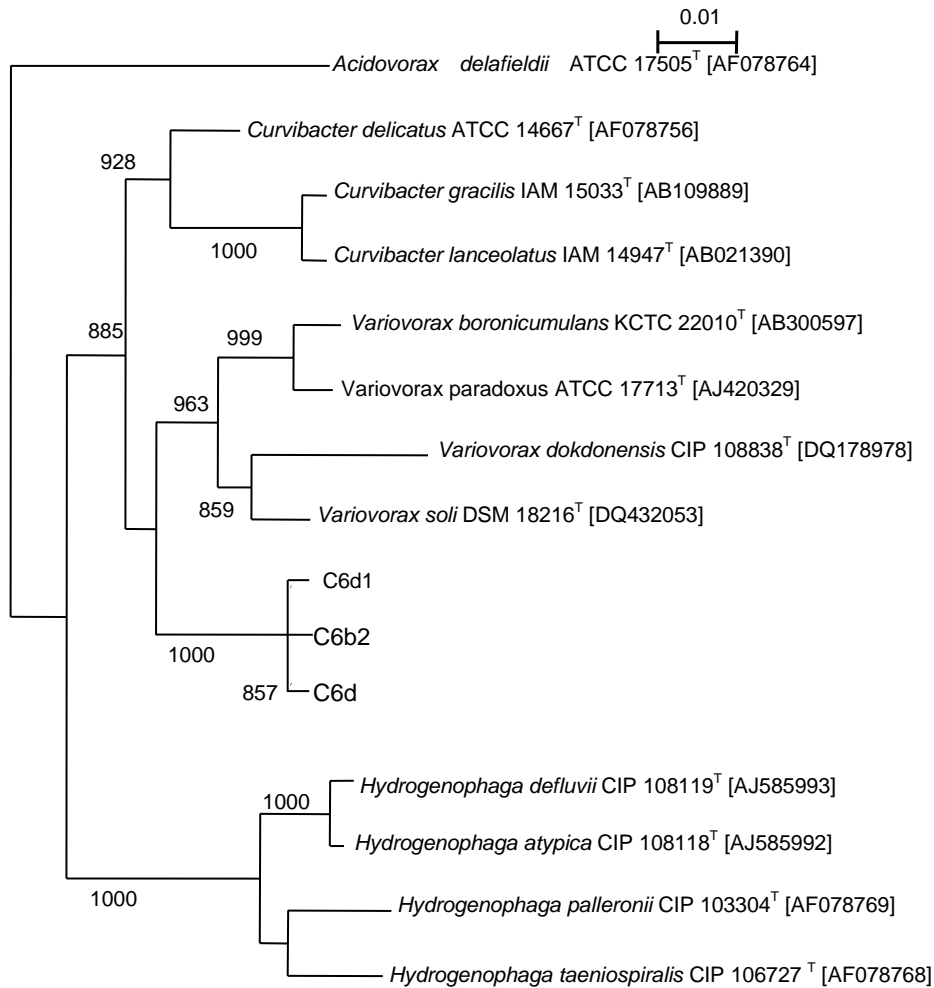
Hình 3. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự của hầu hết chiều dài của gen16S rRNA của chủng vi khuẩn C6b và C6g phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C6

Chủng C6b1 được phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C6, có khuẩn lạc tròn màu trắng có viền sáng huỳnh quang, không ướt, phẳng đến lồi, bề mặt trơn. Loài gần nhất là *Shinella zoogloeoides* ATCC 19623^T (= NBRC 102405^T = JCM 20728^T) với 98,5% giống nhau về trình tự gen 16S rRNA. Cùng với kết quả thể hiện ở cây phát sinh chủng loài (Hình 2), chủng này được định danh đến tên giống là *Shinella*, chưa định danh đến loài, rất có thể đây là loài vi khuẩn mới, tạm đặt tên là *Shinella* sp. C6b1.

Chủng vi khuẩn với ký hiệu C6b và C6g được phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. C6, khuẩn lạc màu từ trắng đến vàng nhạt, hình tròn, viền khô, dạng dẹt đến lồi. Loài gần nhất được xác định là *Aminobacter aminovorans* ATCC 23314^T (= JCM 7852^T) với 99,9% trình tự gen 16S rRNA giống nhau (Hình 3). Cùng với

kết quả thể hiện trên cây phát sinh chủng loài thì hai chủng phân lập được có tên *A. aminovorans*.

Các chủng vi khuẩn C6d, C6d1 và C6b2 phân lập được từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. C6, có khuẩn lạc màu trắng đục, hình tròn, ướt, lồi, khuẩn lạc dạng S. Chúng giống với loài vi khuẩn *Variovorax boronicumulans* NBRC 103145^T là 96,9%; 97,5%; 96,9%; giống với *Variovorax soli* là 96,7%, 97,3%, 97,1% và giống với *Variovorax paradoxus* là 96,6%, 97%, 96,9%, về trình tự gen 16S rRNA. Kết quả trên cây phát sinh chủng loài (Hình 4) và giải trình tự gen cho thấy chủng C6d, C6d1 và C6b2 được định tên đến cấp phân loại giống là *Variovorax*, mà chưa thể phân loại đến loài, chúng được nghi ngờ là loài mới và tạm đặt tên là *Variovorax*I sp. C6d; C6d1 và C6b2. Chúng tôi sẽ thực hiện những nghiên cứu tiếp theo để chứng minh chúng là loài mới.



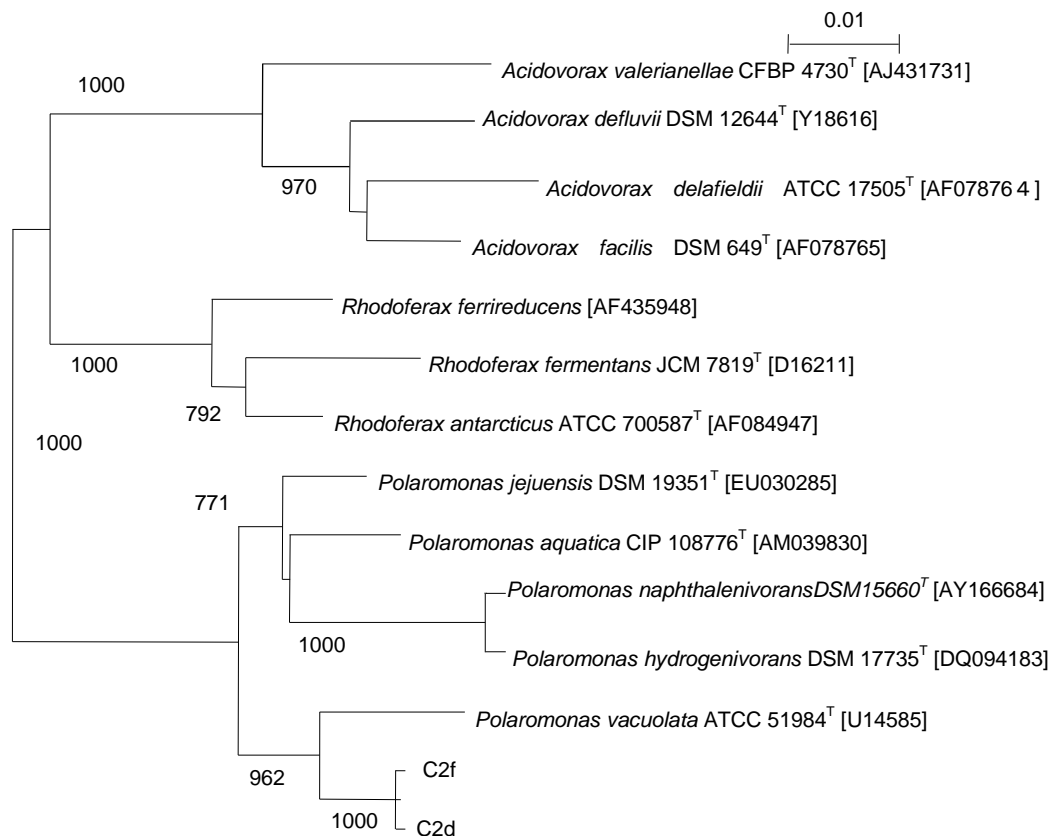
Ghi chú: Những số ở giao điểm thể hiện tần số xuất hiện của một nhóm

Hình 4. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự hầu hết chiều dài của gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn C6d, C6d1 và C6b2 phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C6

Hai chủng C2d và C2f phân lập được từ canh trùng tảo *Chlorella* sp. C2 có khuẩn lạc màu trắng đục, hình tròn, có viền, khuẩn lạc không nhày cũng không khô. Trình tự gen 16S rRNA của chúng giống với loài *Polaromonas aquatica* lần lượt là 97,8%; 97,9%, và loài *Polaromonas vacuolata* là 97,8%; 97,9% và loài *Polaromonas jejuensis* là 97,6%; 97,7%, và dưới 97% so với các loài khác của giống vi khuẩn này. Cùng với kết quả phân tích cây phả hệ (Hình 5), hai chủng vi khuẩn C2d và C2f phân lập được

thuộc về giống vi khuẩn *Polaromonas*, tạm đặt tên là *Polaromonas* sp. C2d và C2f.

Chủng vi khuẩn C2e1 được phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. C2 có đặc điểm khuẩn lạc màu trắng trong, hình tròn, trơn, láng, bóng, dạng S. Với 98,5% trình tự gen 16S rRNA giống với vi khuẩn *Brevundimonas aveniformis* DSM 17033^T (loài gần nhất với chủng phân lập được) cũng như kết quả thể hiện trên cây phả hệ thì chủng C2e1 phân lập được có tên là *Brevundimonas aveniformis* (Hình 6).



Ghi chú: Những số ở giao điểm thể hiện tần số xuất hiện của một nhóm

Hình 5. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự của hầu hết chiều dài của gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn C2d và C2f phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. chủng C2

Hai chủng C2b và C2b1 được phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. C2 có đặc điểm khuẩn lạc màu hồng nhạt, hình tròn, trơn láng dạng S. Loài gần nhất được xác định là *Emticicia ginsengisoli* LMG 23396^T với kết quả giống nhau về trình tự gen 16S rRNA lần lượt là 99,4% và 99,5%. Cùng với kết quả phân tích cây phả hệ (Hình 7), hai loài vi khuẩn phân lập được có tên *Emticicia ginsengisoli*.

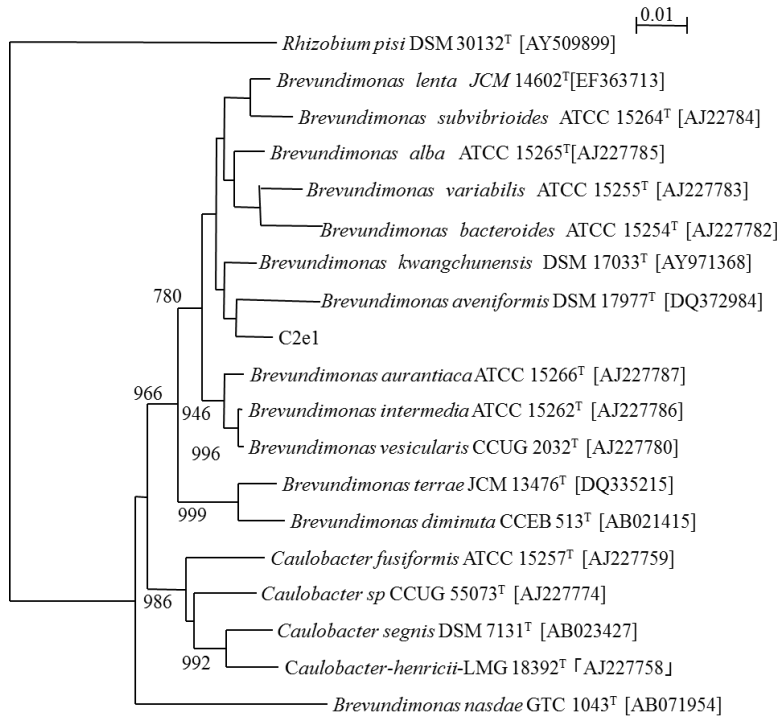
3.3. Thảo luận

Từ hai canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. không thuần khiết, 16 loài vi khuẩn đã được phân lập và xác định tên thuộc về 7 giống vi khuẩn khác nhau. Trong đó giống *Caulobacter* được phân lập ở cả hai canh trùng tảo *Chlorella* sp. chủng C2 và C6, nhưng chúng lại nằm trên hai nhánh khác nhau trên cây phả hệ, điều đó

cho thấy chúng không cùng một loài cho dù ban đầu chúng hình thành trên cùng một môi trường nuôi cấy với những đặc điểm khuẩn lạc giống nhau. Các chủng vi khuẩn còn lại chỉ được phân lập từ một canh trùng nuôi tảo *Chlorella* sp. C2 hoặc C6. Điều đó cho thấy trong môi trường này không chỉ có tảo lựa chọn loài vi khuẩn chung sống cùng mà rất có thể chính vi khuẩn cũng chọn loài tảo mà chúng muốn “hợp tác”.

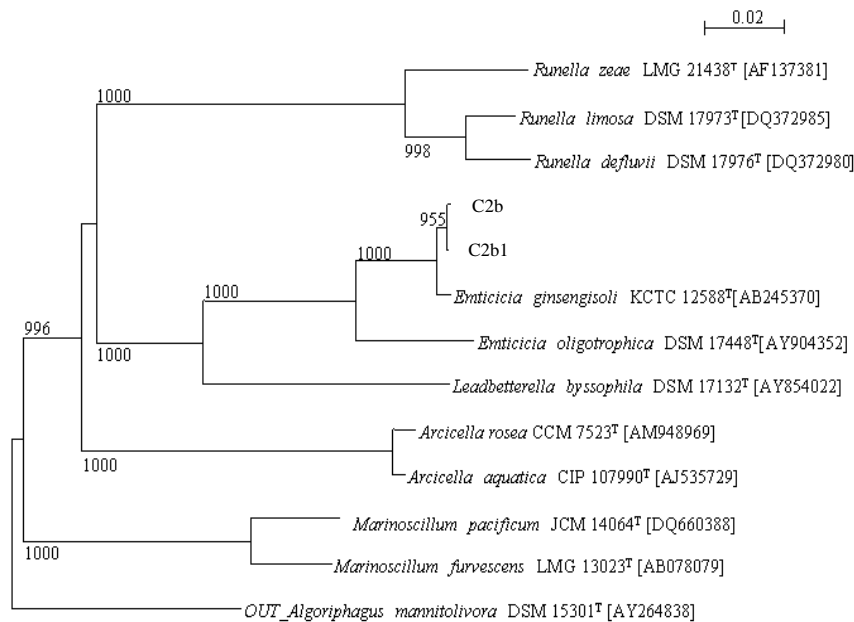
So sánh với thành phần các loài vi khuẩn ở canh trùng tảo *Chlorella* sp. C6 đã được phân tích bằng phương pháp không phân lập (denaturing gradient gel electrophoresis-DGGE) của Otsuka *et al.* (2008), kết quả phân lập vi khuẩn từ canh trùng nuôi tảo chủng C6 ở nghiên cứu này chỉ chiếm một phần nhỏ. Điều đó có thể do có nhiều loài vi khuẩn không thể sinh trưởng phát triển trong điều kiện nuôi cấy

Phân lập, định danh vi khuẩn sống trong canh trùng nuôi tảo *Chlorella* không thuần khiết



Ghi chú: Những số ở giao điểm thể hiện tần số xuất hiện của một nhóm

Hình 6. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự của hầu hết chiều dài của gen16S rRNA của chủng vi khuẩn C2e1 phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella sp.* chủng C2



Ghi chú: Những số ở giao điểm thể hiện tần số xuất hiện của một nhóm

Hình 7. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự của hầu hết chiều dài của gen16S rRNA của chủng vi khuẩn C2b và C2b1 phân lập từ canh trùng nuôi tảo *Chlorella sp.* chủng C2

mà nghiên cứu này sử dụng. Trong nghiên cứu của Otsuka *et al.* (2008) có hai loài vi khuẩn *Caulobacter* và *Brevundimonas* là trùng với nghiên cứu này. Một số loài vi khuẩn *Caulobacter* cho thấy có khả năng phân giải tế bào tảo *Chlorella* (Kawano *et al.*, 1997). Nghiên cứu của Park *et al.* (2008) còn cho thấy một số chủng vi khuẩn *Brevundimonas* sp. có khả năng kích thích sự sinh ở của tảo *Chlorella ellipsoidea*. Do đó, chúng ta cần có những nghiên cứu tiếp theo xem hai loài vi khuẩn *Caulobacter* và *Brevundimonas* phân lập được ở nghiên cứu này có ảnh hưởng như thế nào đến các loài tảo lục, đặc biệt là *Chlorella*.

Với việc phân lập được các chủng vi khuẩn thuần khiết như trên đã mở ra thêm những hướng nghiên cứu thú vị tiếp theo như nghiên cứu chứng minh loài vi khuẩn mới, nghiên cứu về sự ảnh hưởng hay tác động của từng loài vi khuẩn đến sinh trưởng và phát triển của tảo, từ đó tìm ra được chìa khóa mở ra sự hiểu biết về mối quan hệ giữa các loài vi sinh vật với nhau.

4. KẾT LUẬN

Mười sáu chủng vi khuẩn đã được phân lập từ hai canh trùng nuôi tảo lục *Chlorella* sp. C2 và C6, đã được xác định được đến tên giống. Chúng thuộc về 7 giống là: *Caulobacter*, *Shinella*, *Aminobacter*, *Variovorax*, *Polaromonas*, *Brevundimonas*, *Emticicia*. Một số chủng vi khuẩn như C6a1, C6a2; C6b1; C6d, C6d1, C6b2 có thể là loài mới, vì vậy cần có những nghiên cứu tiếp theo sau nghiên cứu này.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn giáo sư Keishi Senoo, phó giáo sư Shigeto Otsuka, Trường đại học Tokyo đã cung cấp 2 canh trùng tảo lục *Chlorella* sp. C2 và C6 cũng như các phương tiện và hỗ trợ tài chính cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bell, W.H. and Mitchell, R. (1972). Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol Bull.*, 143: 265-277.
 Cole, J.J. (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*,

13: 291-314.
 Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.*, 35: 169-172.
 Croft, M.T., A.D. Lawrence, E. Raux-Deery, M.J. Warren, and A.G. Smith (2005). Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 483: 90-93.
 Ichimura, T. (1971) Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In *Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium*, ed. by Nishizawa, K., University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 208-214.
 Kawano, Y., Y., Nagawa., H, Nakanishi., H, Nakajima., M, Matsuo., and T, Higashihara (1997). Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter* sp. and its antimicrobial activities. *J Mar Biotechnol.*, 5: 225-229
 Kim, B.Y., Weon, H.Y., Yoo, S.-H., Lee, S.Y., Kwon, S.W., Go, S.J. and Stackebrandt, E. (2006). *Variovorax soli* sp. nov., isolated from greenhouse soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56: 2899-2901.
 Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.*, 5: 150-163.
 Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., Mcgettigan, P.A., Mcwilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
 Otsuka, S., Y. Abe, R. Fukui, M. Nishiyama, and K. Senoo (2008a). Presence of previously undescribed bacterial taxa in non-axenic *Chlorella* cultures. *J. Gen. Appl Microbiol.*, 54: 187-193.
 Park, Y., K.W. Je, K. Lee, S.E. Jung, and T.J. Choi (2008). Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. *Hydrobiologia*, 598: 219-228.
 Ueda, H., S. Otsuka, and K. Senoo (2009). Community composition of bacteria co-cultivated with microalgae in non-axenic algal cultures. *Microbiol. Cult. Coll.*, 25: 21-25.
 Ueda, H., S. Otsuka, and K. Senoo (2010). Bacterial communities constructed in artificial consortia of bacterial and *Chlorella vulgaris*. *Mircobes and Invironments*, 25: 36-40.
 Watanabe, K., N. Takihana, H. Aoyagi, S. Hanada, Y. Watanabe, N. Ohmura, H. Saiki, and H. Tanaka (2005). Symbiotic association in *Chlorella* culture. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 51: 187-196.