

SO SÁNH SỰ ĐA DẠNG VỀ VI KHUẨN HIẾU KHÍ SINH NỘI BÀO TỬ TẠI RỪNG QUỐC GIA HOÀNG LIÊN VÀ CÁC VÙNG ĐẤT NÔNG NGHIỆP LÂN CẬN

TRỊNH THÀNH TRUNG, NGUYỄN THỊ THU THỦY, NGUYỄN MẠNH HÙNG,
ĐÀO THỊ LƯƠNG, DƯƠNG VĂN HỢP

Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Vi khuẩn hiếu khí sinh nội bào tử (HKSNT) là một nhóm lớn gồm nhiều loài có khả năng sinh nội bào tử - một dạng thích nghi của tế bào để chống lại các điều kiện khắc nghiệt của môi trường sống như khô, nóng, thiếu dinh dưỡng. Nhóm vi khuẩn này phân bố rộng rãi trong các hệ sinh thái, từ trên cạn đến dưới nước, từ nước ngọt đến nước biển, từ vùng ven bờ đến đáy các đại dương [14]. Trước đây, vi khuẩn HKSNT thường được biết đến như là các loài thuộc chi *Bacillus*. Năm 1991, Ash và cs. đã đặt nền móng thiết lập khóa phân loại hiện đại cho nhóm vi khuẩn này dựa trên trình tự gen mã hóa riboxôm 16S [1]. Cùng với những ứng dụng các kỹ thuật hiện đại trong công tác phân loại vi sinh vật và việc mở rộng nghiên cứu các khu hệ sinh thái đặc biệt, rất nhiều loài vi khuẩn HKSNT đã được mô tả [11]. Đến nay, vi khuẩn HKSNT được xác định là nhóm *Bacillus sensu lato* gồm 37 chi nằm trong 3 họ khác nhau là Bacillaceae, Paenibacillaceae và Alicyclobacillaceae, trong đó *Bacillus* chỉ là một chi được gọi là nhóm *Bacillus sensu stricto* [5].

Các nghiên cứu về vi khuẩn HKSNT tăng lên đáng kể trong những năm gần đây dẫn đến sự gia tăng đột biến về số lượng loài làm thay đổi nhanh chóng hệ thống phân loại của nhóm vi khuẩn này. Bên cạnh đó, việc phát hiện những chủng và loài vi khuẩn mới cũng góp phần tìm ra tiềm năng mới của vi khuẩn HKSNT, trong đó có các sản phẩm trao đổi chất bậc hai [6, 12].

Sa Pa có Rừng Quốc gia Hoàng Liên là rừng nguyên sinh còn được bảo tồn khá tốt về đa dạng sinh học. Xung quanh rừng là ruộng nương, là kết quả của việc khai phá rừng nguyên sinh tự nhiên thành đất canh tác. Quá trình chuyển đổi đất này cũng làm thay đổi hệ vi sinh vật cư trú trong đất. Nghiên cứu này đánh giá khái quát sự đa dạng về thành phần loài vi khuẩn HKSNT ở hệ sinh thái đất rừng Hoàng Liên và hệ sinh thái đất nông nghiệp xung quanh rừng. Bước đầu xác định mối liên quan của hệ vi khuẩn HKSNT giữa hai hệ sinh thái này.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Thu thập mẫu đất

Khảo sát và thu mẫu được tiến hành giữa tháng 11 năm 2010. Tại mỗi hệ sinh thái đất rừng Hoàng Liên và hệ sinh thái đất nông nghiệp đã lấy 9 mẫu đất, mỗi mẫu lấy 200 g. đất ở độ sâu 10 cm (Bảng 1). Tại các mỗi điểm lấy mẫu, các thông số địa lý, môi trường như tọa độ, độ cao, nhiệt độ, độ ẩm không khí cũng đã được ghi nhận.

2. Phân lập vi khuẩn HKSNT

Định lượng 10 g đất cho vào bình tam giác 250 ml chứa 90 ml nước muối sinh lý (NaCl 0,85%). Lắc ở tốc độ 220 vòng/phút trong 30 phút. Đặt yên bình tam giác trong 10 phút để loại bỏ các tế bào sinh dưỡng không sinh nội bào tử. Pha loãng phần dịch chiết đất đã xử lý nhiệt thành 10, 100 và 1000 lần. Cây 100 µl các dịch pha loãng lên 3 đĩa petri chứa môi trường Nutrient Agar

(Becton, Dickinson) có bổ sung với cycloheximide (100 μ g/ml) và ủ ở 25 °C trong 7 ngày. Đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa với nồng độ pha loãng thích hợp (~ 100 khuẩn lạc/ đĩa petri). Số lượng vi khuẩn hiếu khí trong 1 g đất được tính theo công thức: CFU/ g đất = số lượng vi khuẩn mọc trên đĩa thạch x 100 x hệ số pha loãng.

Trên mỗi mẫu phân lập, tiến hành cấy ria các chủng có các đặc điểm khác biệt hình thái khuẩn lạc sang các đĩa petri khác. Sau 2 ngày nuôi cấy ở 30 °C, khuẩn lạc thuần được cất giữ ở - 80°C trong môi trường Luria-Bertani dịch thể chứa 20% glycerol.

3. Phân tích DNAr 16S

DNA của các chủng vi khuẩn được tách chiết theo phương pháp của Gabor và cs. (2003). Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCA GCC-3'). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Qiaquick (Qiagen). 20 ng sản phẩm PCR tinh sạch được đưa vào các phản ứng khuếch đại sử dụng kit Bigdye® terminator v3.1 (Applied Biosystem). Phản ứng trình tự với 2 mồi là 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') và 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Trình tự DNA được đọc trên máy 3100 Avant Genetic Analyzer sử dụng POP-6 polymer. Chính sửa trình tự trên Chromas Lite 2.01. Các đoạn trình tự được công bố trên Genbank. Cây phát sinh chủng loại được xác định theo Neighbor joining sử dụng phép toán Jukes-Cantor với độ lặp lại 1.000 lần trên phần mềm Mega 5.03.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Xác định sơ bộ một số tính chất đất

Kết quả xác định các thông số về độ ẩm, pH trong dịch chiết đất của 2 loại đất rừng và đất nông nghiệp Sa Pa cho thấy pH của 2 loại đất này nằm trong khoảng axit yếu (từ 6,0 đến 6,52) và không có sự khác biệt lớn (Bảng 1). Độ ẩm trung bình của đất rừng là 38,9% (26,1-53,3%) trong khi độ ẩm trung bình của đất nông nghiệp là 30,2% (15,1-49%). Kết quả này phù hợp với thực địa vì đất trong rừng thường nằm ở dưới lớp thảm lá rụng nên giữ ẩm và có độ ẩm cao hơn so với đất nông nghiệp. Sự khác biệt về độ ẩm giữa 2 khu hệ sinh thái này dẫn đến sự khác biệt về thành phần loài vi sinh vật phân bố trong các khu hệ sinh thái đó.

2. Xác định nhiệt độ tối ưu cho nuôi cấy các loài vi khuẩn HKSNT

Đặc trưng của Sa Pa là nơi có khí hậu ôn đới, nhiệt độ thấp hơn so với các vùng trong cả nước. Tại thời điểm lấy mẫu, nhiệt độ dao động từ 13,8°C đến 18,3°C (Bảng 1). Để đánh giá mức độ đa dạng các loài vi khuẩn HKSNT, cần xác định nhiệt độ tối ưu để vi khuẩn phát triển trên môi trường nuôi cấy. Lựa chọn dịch chiết đất đã nhiệt hóa ở 80°C trong 10 phút của 3 mẫu đất rừng SPH 01, 02 và 03 và nuôi cấy chúng trên môi trường Nutrient Agar ở các nhiệt độ 15°C, 25°C, 35°C và 45°C. Sau 10 ngày nuôi cấy, số lượng vi khuẩn mọc nhiều nhất ở nhiệt độ 25°C trên tất cả 3 mẫu (Hình 1). Số lượng vi khuẩn giảm đáng kể khi nuôi cấy ở nhiệt độ 35°C hay thậm chí không mọc ở mẫu SPH 02 và 03 khi nuôi cấy ở 45°C. Ở nhiệt độ 15°C, số lượng vi khuẩn cũng tương đương so với nhiệt độ 25°C. Tuy nhiên, nếu quan sát theo từng ngày nuôi cấy thì vi khuẩn mọc ở nhiệt độ này chậm hơn so với ở nhiệt độ 25°C. Vì vậy, nhiệt độ nuôi cấy tối ưu 25°C được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3. Xác định số lượng khuẩn lạc của nhóm vi khuẩn HKSNT

Giá trị trung bình về lượng vi khuẩn hiếu khí mang nội bào tử hoặc bào tử có ở trong mẫu đất rừng là 2,37 x 10⁵ CFU/g đất với biên độ dao động từ 0,78 x 10⁵ đến 4,68 x 10⁵ CFU/g. (Bảng 2). Giá trị trung bình về lượng vi khuẩn hiếu khí mang nội bào tử hoặc nội bào tử có ở

trong mẫu đất nông nghiệp là $2,95 \times 10^5$ CFU/g đất với biên độ dao động từ $0,01 \times 10^5$ đến $11,93 \times 10^5$ CFU/g.

Bảng 1

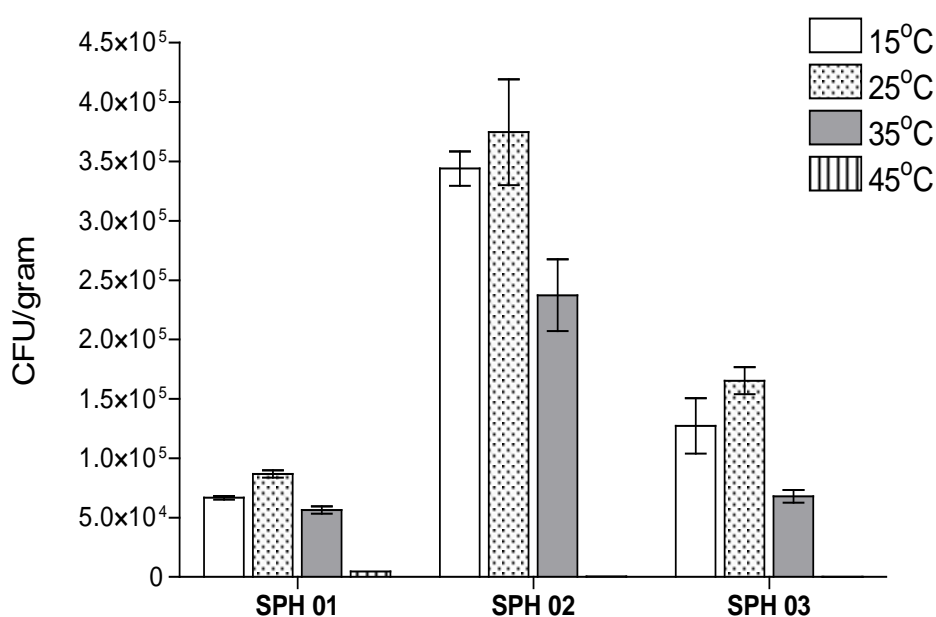
Vị trí lấy mẫu và các thông số liên quan đến mẫu

KH mẫu	Loại đất	Vị trí tọa độ	Độ cao	Độ ẩm KK (%)	Nhiệt độ KK (°C)	Độ ẩm đất (%)	pH đất
SP01	Đất rừng	22° 20' 48" N 103° 46' 09" E	1895	45,9	17,0	53,3	6,2
SP02	Đất rừng	22° 20' 51" N 103° 46' 10" E	1859	42,0	13,0	36,7	6,4
SP03	Đất rừng	22° 20' 53" N 103° 46' 11" E	1896	51,8	14,5	37,6	6,1
SP04	Đất rừng	22° 20' 56" N 103° 46' 14" E	1897	45,9	14,0	40,1	6,5
SP05	Đất rừng	22° 21' 00" N 103° 46' 18" E	1901	42,7	14,5	44,9	6,3
SP06	Đất rừng	22° 21' 02" N 103° 46' 18" E	1902	34,2	13,8	30,8	6,1
SP07	Đất rừng	22° 21' 03" N 103° 46' 19" E	1912	40,1	13,8	28,3	6,3
SP08	Đất rừng	22° 46' 20" N 103° 21' 03" E	1926	42,1	14,3	26,1	6,5
SP09	Đất rừng	22° 17' 04" N 103° 53' 36" E	1412	52,2	18,3	53,1	6,4
SP10	Đất atiso	22° 21' 11" N 103° 51' 30" E	1360	56,3	14,6	26,2	6,4
SP11	Đất lúa	KXD	KXD	KXD	15,1	40,5	6,1
SP12	Đất lúa	KXD	KXD	KXD	15,2	34,0	6,0
SP13	Đất lúa	KXD	KXD	KXD	15,7	31,7	6,0
SP14	Đất lúa	KXD	KXD	KXD	15,2	49,0	6,1
SP15	Đất ngô	KXD	KXD	KXD	15,6	15,8	6,3
SP16	Đất cải xanh	KXD	KXD	KXD	16,0	32,3	6,4
SP17	Đất ngô	22° 23' 47" N 103° 53' 29" E	1151	57,4	15,8	23,2	6,1
SP18	Đất hành	22° 23' 48" N 103° 53' 19" E	1106	59,6	15,4	19,1	6,2

Ghi chú: KXD: Không xác định, KK: Không khí.

Phân tích thống kê (Student's t-test) cho thấy số lượng vi khuẩn hiếu khí mang nội bào tử hoặc nội bào tử có trong đất ở 2 vùng sinh thái nghiên cứu là như nhau ($p > 0,05$), biên độ dao động về số lượng vi khuẩn hiếu khí mang nội bào tử hoặc nội bào tử khác nhau rõ rệt, với biên độ dao động trong đất nông nghiệp lớn hơn đất rừng ($p < 0,01$). Sự khác biệt về mức độ dao động về số lượng các loài vi khuẩn cư trú trong đất có thể là yếu tố chi thị cho sự thoái hóa đất [2].

Dựa vào các đặc điểm khác biệt về màu sắc, kích thước, cấu trúc bề mặt và mép viền ngoài khuẩn lạc, chúng tôi tiến hành phương pháp cấy rìa để tinh sạch và lưu giữ chủng giống. Tổng số chủng vi khuẩn HKSNTB được phân lập từ 18 mẫu đất ở Sa Pa là 314, trong đó 164 chủng từ đất rừng và 150 chủng từ đất nông nghiệp.



Hình 1: Số lượng vi khuẩn trong mẫu đất rừng khi phân lập ở nhiệt độ khác nhau

4. Phân loại các chủng vi khuẩn HKSNTB

Nhằm đánh giá sự khác biệt về thành phần loài vi khuẩn HKSNTB có trong mẫu đất rừng và đất nông nghiệp Sa Pa đã tiến hành cấy rìa 100 chủng trong 5 mẫu đất rừng (SP 01, 02, 03, 04 và 05). Trên cơ sở so sánh hình thái khuẩn lạc giữa các chủng trong cùng một mẫu và giữa các chủng ở các mẫu khác nhau, đã chọn được 33 chủng cho phân loại bằng kỹ thuật giải trình tự gen mã hóa riboxôm 16S. Trong đó, trong số 73 chủng lưu giữ từ 5 mẫu đất nông nghiệp (SP 12, 13, 14, 15 và 16) cũng chọn được 29 chủng có các đặc điểm khác biệt về hình thái khuẩn lạc cho các bước phân loại và định loại tiếp theo.

Từ 62 chủng vi khuẩn HKSNTB được giải trình tự, khi so sánh mức độ tương đồng đoạn DNAr 16S với các chủng chuẩn trên Genbank, đã xác định 25 loài, 5 chi của 3 họ khác nhau. Trong đó họ Bacillaceae có 47 chủng (79%) thuộc 18 loài chi *Bacillus*, 9 chủng (11%) thuộc 3 loài chi *Lysinibacillus*. Họ Paenibacillaceae có 3 chủng (5%) thuộc 2 loài chi *Paenibacillus* và 1 chủng thuộc chi *Brevibacillus*. 1 chủng còn lại thuộc chi *Rummellibacillus* của họ

Planococcaceae. Vị trí phân loại và quan hệ họ hàng của các chủng/loài trên cây phát sinh được trình bày trong hình 2.

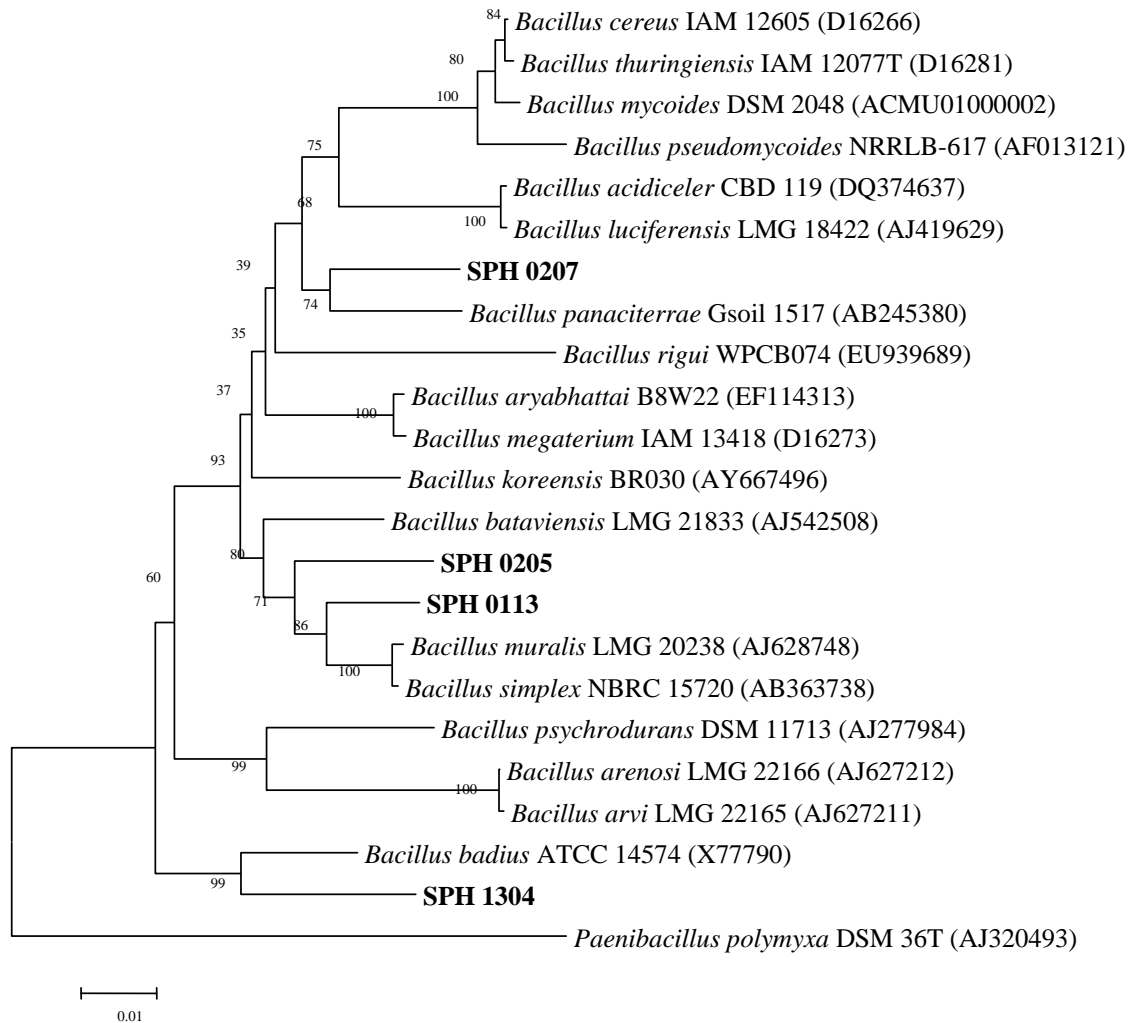
Bảng 2

Các loài vi khuẩn HKSNT ở Sa Pa

STT	Tên loài	Số lượng (n = 61)	Phân bố	Mức độ tương đồng	Mã hiệu đoạn DNAr 16S
Chi <i>Bacillus</i>					
1.	<i>B. acidicer</i>	5	R + NN	98,69 - 99,93	DQ374637
2.	<i>B. arenosi</i>	2	R	99,93 - 100,00	AJ627212
3.	<i>B. arvi</i>	3	R	100,00	AJ627211
4.	<i>B. aryabhatai</i>	5	NN	99,72 - 99,93	EF114313
5.	<i>B. badius</i>	1	NN	96,23	X77790
6.	<i>B. bataviensis</i>	2	R + NN	98,91 - 99,44	AJ542508
7.	<i>B. cereus</i>	1	NN	99,93	AE016877
8.	<i>B. koreensis</i>	1	NN	99,93	AY667496
9.	<i>B. luciferensis</i>	1	R	98,88	AJ419629
10.	<i>B. megaterium</i>	1	NN	99,82	D16273
11.	<i>B. muralis</i>	2	R	96,83 - 99,86	AJ628748
12.	<i>B. mycoides</i>	6	R	99,93 - 100,00	ACMU01000002
13.	<i>B. panaciterrae</i>	1	R	96,63	AB245380
14.	<i>B. pseudomycoides</i>	2	NN	98,93 - 100,00	ACMX01000133
15.	<i>B. psychrodurans</i>	3	R	98,56 - 99,04	AJ277984
16.	<i>B. rigui</i>	1	NN	99,86	EU939689
17.	<i>B. simplex</i>	6	R + NN	97,24 - 99,92	AB363738
18.	<i>B. thuringiensis</i>	4	NN	99,85 - 99,93	ACNF01000156
Chi <i>Brevibacillus</i>					
19.	<i>B. choshinensis</i>	1	R	99,72	AB112713
Chi <i>Lysinibacillus</i>					
20.	<i>L. fusiformis</i>	2	NN	100,00	AB271743
21.	<i>L. sphaericus</i>	1	R	99,45	AJ310084
22.	<i>L. xylanilyticus</i>	6	R + NN	99,63 - 100,00	FJ477040
Chi <i>Paenibacillus</i>					
23.	<i>P. peoriae</i>	1	NN	99,37	AJ320494
24.	<i>P. terrae</i>	2	R	99,49	AF391124
Chi <i>Rummeliibacillus</i>					
25.	<i>R. pycnus</i>	1	R	98,55	AB271739

Ghi chú: R: Đất rừng; NN: Đất nông nghiệp.

Các loài có tần suất gặp nhiều nhất là *Bacillus simplex* (6 chủng), *Bacillus mycoides* (6 chủng), *Lysinibacillus xylanilyticus* (6 chủng), *Bacillus acidicer* (5 chủng), *Bacillus aryabhatai* (5 chủng), *Bacillus thuringiensis* (4 chủng), *Bacillus arvi* (3 chủng), *Bacillus psychrodurans* (3 chủng). Trong số các loài gặp với tần suất cao này, loài *Bacillus mycoides*, *Bacillus arvi* và *Bacillus psychrodurans* chỉ gặp trong đất rừng, loài *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus thuringiensis* chỉ gặp trong đất nông nghiệp. Các loài gặp với tần suất cao khác có ở cả trong đất rừng và đất nông nghiệp.



Hình 2: Cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Bacillus* phân lập ở Sa Pa

3 chủng SPH 0205, 0207 và 1304 có chỉ số tương đồng < 97% và chủng SPH 0113 có chỉ số tương đồng là 97,27% so với các chủng chuẩn được hiển thị chữ đậm trên cây phát sinh.

Trong các mẫu đất nông nghiệp, có 3 loài khá phổ biến và thường gặp là *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus megaterium*. Đặc biệt, cả 3 loài này lại không có mặt trong các mẫu đất rừng. Hơn nữa, trong số 12 chủng phân loại vào 6 loài thuộc 4 chi không phải là chi *Bacillus*, chỉ có 2 chủng trong mẫu đất nông nghiệp được xác định là *Paenibacillus peoriae* và *Lysinibacillus xylanilyticus*, 10 chủng còn lại là các chủng có trong mẫu đất rừng. Kết quả trên cho thấy có sự sai khác về thành phần loài vi khuẩn HKSNT giữa khu hệ sinh thái đất rừng tự

nhiên và đất nông nghiệp, trong đó sự đa dạng về loài và chi ở đất rừng tự nhiên cao hơn so với đất nông nghiệp. Trong cùng một loài, mức độ tương đồng về trình tự ADN của đoạn gen mã hóa riboxôm 16S ở tất cả các chủng có thể là 100% so với trình tự của chủng chuẩn (như loài *Bacillus arvi* và *Bacillus fusiformis*) hoặc có thể dao động theo các tỷ lệ khác nhau phụ thuộc vào các loài khác nhau (Bảng 2). Trong số các chủng được so sánh trình tự DNA 16S, có 3 chủng SPH 0205, 0207 và 1304 có mức độ tương đồng cao nhất so với các loài chuẩn luôn nhỏ hơn 97%, 3 chủng này đều thuộc chi *Bacillus* và nằm tách biệt trên cây phân phát sinh (Hình 2). Đặc biệt, chủng SPH 0113 có mức độ tương đồng ADN cao nhất là 97,27%. Trên cây phát sinh chủng loại, chủng SPH 0113 nằm liền kề với chủng SPH 0205 song độ tương đồng đoạn DNAr 16S của 2 chủng vi khuẩn này là 95%. Vùng trình tự sai khác nhau nhiều nhất trong đoạn DNAr 16S của 2 chủng vi khuẩn nằm ở khoảng phía đầu trình tự đoạn DNAr 16S.

III. KẾT LUẬN

Số lượng vi khuẩn HKSNTB đạt cao nhất trong môi trường nuôi cấy dịch chiết đất ở nhiệt độ 25°C. Số lượng vi khuẩn hiếu khí mang nội bào tử hoặc bào tử có ở trong mẫu đất rừng là $2,37 \times 10^5$ CFU/g. đất và trong đất nông nghiệp là $2,95 \times 10^5$ CFU/g. Biên độ dao động về số lượng vi khuẩn trong đất nông nghiệp ($0,01 \times 10^5$ - $11,93 \times 10^5$) lớn hơn đất rừng ($0,78 \times 10^5$ - $4,68 \times 10^5$).

Kết quả phân tích và so sánh trình tự DNAr 16S của 62 chủng đã xác định 25 loài thuộc 5 chi là *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillaceae*, *Brevibacillus* và *Rummellibacillus*, trong đó, 47 chủng thuộc chi *Bacillus*. Một số loài chỉ thấy trong đất rừng như *B. mycooides*, *B. arvi* và *B. psychrodurans* hoặc chỉ thấy có trong đất nông nghiệp như *B. aryabhatai*, *B. thuringiensis* và *B. cereus*. Ba chủng SPH 0205, 0207 và 1304 có chỉ số tương đồng đoạn DNAr 16S nhỏ hơn 97% và 1 chủng SPH 0113 có chỉ số tương đồng cao nhất là 97,27 %.

Mặc dù có số lượng loài vi khuẩn HKSNTB là như nhau, nhưng số chi trong đất rừng cao hơn đất nông nghiệp. Kết quả bước đầu đã khẳng định tính đa dạng của vi khuẩn HKSNTB trong hệ sinh thái đất rừng Sa Pa.

Ghi nhận: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ “Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen vi sinh vật” thuộc chương trình Quỹ Gen, Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ash C., F. J. A. E. A. Wallbank, S. M. D. Collin, 1991: *Letters in Applied Microbiology* 13: 202-206.
2. Axelrood P. E., M. L. Chow, C. S. Arnold, K. Lu, J. M. McDermott, J. Davies, 2002: *Can. J. Microbiol* 48(7): 643-654.
3. Chenu C., J. Hassink, J. Bloem, 2001: *Biol. Fertil. Soils* 34(5): 349-356.
4. Ghosh A., B. Maity, K. Chakrabarti & D. Chattopadhyay, 2007: *Microb. Ecol.* 54(3): 452-459.
5. Goldman E., L. H. Green, 2009: *Practical handbook of microbiology*. CRC Press.
6. Nithya C., S. K. Pandian, 2010: *Microbiol. Res.* 165(7): 578-593.
7. Opelt K., G. Berg, 2004: *Appl Environ. Microbiol.* 70(11): 6569-6579.
8. Pansu M., J. Gautheyrou, 2006: *Handbook of soil analysis*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

9. Paul E.A., 2007: Soil microbiology, ecology, and biochemistry. Academic Press.
10. Porwal S., S. Lal, S. Cheema & V.C. Kalia, 2009: PLoS One 4(2)e: 4438.
11. Shivaji S., P. Chaturvedi, K. Suresh, G. S. Reddy, C. B. Dutt, M. Wainwright, J. V. Narlikar, P.M. Bhargava, 2006: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(7): 1465-1473.
12. Singh S. B., F. Pelaez, 2008: Prog. Drug. Res. 65 (141): 143-174.
13. Vos P. D., G. M. Garrity, D. Jones N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, W.B. Whitman, 2009: Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer Science.
14. Zhang L., G.L. Wu, Y. Wang, J. Dai & C.X. Fang, 2011: Antonie Van Leeuwenhoek 99(2): 221-229

BIODIVERSITY OF AEROBIC ENDOSPORE-FORMING BACTERIA ISOLATED FROM HOANG LIEN NATIONAL PARK AND SURROUNDING AGRICULTURAL LANDS

**TRINH THANH TRUNG, NGUYEN THI THU THUY, NGUYEN MANH HUNG
DAO THI LUONG, DUONG VAN HOP**

SUMMARY

An equal number of soil samples ($n = 9$) was collected from forest land of Hoang Lien National Park and its surrounding agricultural land for isolation of aerobic endospore-forming bacteria. The optimal temperature for AEFB culture was established at 25°C. Culturable AEFB in the forest and agriculture lands were determined at 2.37×10^5 CFU/g soil and 2.95×10^5 CFU/ g soil, respectively. Variation in the number of AEFB in the agricultural land was significant higher than that of the forest land ($0.78 \times 10^5 - 4.68 \times 10^5$ versus $0.01 \times 10^5 - 11.93 \times 10^5$, $p < 0.01$).

The DNAr 16S sequencing analysis of 62 bacterial isolates revealed 25 AEFB species belonging to five genera (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillaceae*, *Brevibacillus* and *Rummellibacillus*). Of those, *Bacillus* was predominant (47 isolates). Some species such as *B. mycooides*, *B. arvi* and *B. psychrodurans* were recorded only in the agricultural land whereas species of *B. mycooides*, *B. arvi* and *B. psychrodurans* were only found in the forest land. Three isolates SPH 0205, 0207 and 1304 was determined the highest sequencing similarities with below 97% and SPH 0113 was determined the highest sequencing similarity with 97.27%. Although the number of species obtained from two distinct ecological areas was equal, the number of genera isolated in the forest land was higher than that in the agricultural land.

The preliminary results confirmed the high biodiversity of the AEFB as well as the potential bioresources for isolating of new species in the forest land. Those new species would benefit for the discovery of novel bioactive compounds.