Use of Molecular Biology Techniques in Studying the Nitrifying Bacteria Community from Shrimp Farming System

Chanyarat Paungfoo

Doctor of Philosophy Thesis in Biotechnology
Prince of Songkla University
2004

T
เลขหมู่ QR82.N5 C42 2004
Bib Key 241181
- 3 ส.ค. 2547

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาไนตริไฟอิงแบคทีเรียในนากุ้งโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

ผู้เขียน น.ส. จรรยารัตน์ พ่วงฟู

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2546

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงกุ้งมีบทบาทสำคัญยิ่งต่อการเติบโตของเศรษฐกิจไทยและหลายๆประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สารประกอบไนโตรเจนที่สะสมในบ่อเลี้ยงเป็นพิษต่อสัตว์น้ำและทำให้เกิดมลภาวะทางแหล่งน้ำ กระบวนการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนของแบคทีเรียไนตริไฟอิงเป็นที่ทราบกันดีแต่ยังขาดความเข้าใจด้านนิเวศวิทยาของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในบางประเด็น งานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียไนตริไฟอิงจากธรรมชาติ (น้ำและดินจากบ่อกุ้ง) และจากกล้าเชื้อทางการค้าที่สามารถกำจัดแอมโมเนียได้ดีที่สุดเพื่อเป็นกล้าเชื้อในถังเอสบีอาร์เพื่อศึกษาโครงสร้างนิเวศวิทยา เอสบีอาร์สองถังควบคุมสภาวะเหมือนกันยกเว้นกล้าเชื้อซึ่งได้จากธรรมชาติ (น้ำและดินจากบ่อกุ้ง) และจากกล้าเชื้อทางการค้า ป้อนด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแอมโมเนียมไนโตรเจน 100 มก/ล และความเค็ม 25 ก/ล ผลการวิเคราะห์ทางเคมีและการตรวจนับด้วยเทคนิคเอ็มพีเอ็น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไนตริไฟอิงทั้งกลุ่มที่ใช้แอมโมเนียและไนไตรท์ (AOB และ NOB) เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง และกล้าเชื้อจากธรรมชาติมีประสิทธิภาพในการกำจัดแอมโมเนียได้ดีกว่ากล้าเชื้อทางการค้า ซึ่งเห็นได้จากการกำจัดแอมโมเนียได้มากกว่าในขณะที่มีปริมาณของเชื้อน้อยกว่า จากการศึกษาแบคทีเรียไนตริไฟอิงที่เพิ่มจำนวนจากกล้าเชื้อจากธรรมชาติในถังเอสบีอาร์ (NFSBR)โดยเทคนิคชีวโมเลกุล พบว่าสองโคลนจาก Bacterial clone library; (27f and 1492r ไพรเมอร์) และโคลนจำนวนมากของ AOB clone library (190f and 1492rไพรเมอร์) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Nitrosomonas nitrosa* ในกลุ่ม *Nitrosomonas communis* ผลที่ได้จากการใช้เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มใหญ่ของ AOB เป็นกลุ่มที่ติดกับโพรบ NSO1225 และ NSO190 (21±2% ของแบคทีเรียทั้งหมด) แต่ไม่พบกลุ่ม NOB ติดกับโพรบที่จำเพาะต่อ *Nitrobacter* และ *Nitrospira* เลย ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่ามีกลุ่ม NOB ที่อาศัยในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็มชนิดใหม่อยู่ในระบบ จึงทำการเพิ่มจำนวน NOB ดังกล่าวโดยนำเชื้อจากถัง NFSBR เลี้ยงในเอสบีอาร์สองถังที่มีความเข้มข้นของไนไตรท์สูงและต่ำ (HNOBSR และ LNOBSBR) จากผลการทดลองโดยใช้เทคนิค FISH ไม่พบ *Nitrospira* และพบ *Nitrobacter* เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเชื้อที่ไม่ทราบ

ชนิดที่มีลักษณะเหมือนแบคทีเรียไนตริไฟอิง จึงไม่น่าเป็นไปได้ที่ปริมาณของ *Nitrobacter* เพียงเล็กน้อยที่พบจะสามารถกำจัดไนไตรท์ได้ในอัตราที่สูง

เพื่อพิสูจน์ว่ามี NOB ชนิดใหม่ในระบบจึงทำ 16S rDNA clone library จำนวน 3 clone library ด้วย DNA จาก NFSBR HNOBSBR และ LNOBSBR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ให้จำเพาะกับ *Nitrospira marina* (SNtsp1010) ผลการทดลองพบว่า OTU1 เป็นกลุ่มเด่นในทุก clone library ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่า OTU1 เป็นกลุ่มสำคัญของแบคทีเรียที่กำจัดไนไตรท์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบส (BLAST) ของ OTU1 กับข้อมูลในฐานข้อมูลพบว่าไม่สัมพันธ์กับเชื้อใด ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า OTU1 เป็นลำดับเบสของเชื้อ NOB ชนิดใหม่ อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสของ OTU1 ไม่ได้อยู่บนลำดับจีนของ 16S rRNA ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า primer 27f และ SNtsp1010r เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ 16S rDNA

ทำการทดลองเพื่อค้นหา NOB ชนิดใหม่นี้ จากการทดลองพบ 1 โคโลนี (HA1) จาก 37 โคโลนีที่แยกได้จาก HNOBSBR และ LNOBSBR มีลำดับเบสตรงกับไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ให้จำเพาะกับ OTU1 (ChanyF และ ChanyR) และสามารถใช้ ไนไตรท์ไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มก/ล ได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า HA1 อาจจะเป็น NOB ชนิดใหม่ที่เด่นในทุกระบบ แต่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ เนื่องจากลำดับเบสไม่สัมพันธ์กับเชื้อใดๆในฐานข้อมูลที่มีอยู่ในขณะนี้ และยังไม่มีข้อมูลมากพอที่จะยืนยันศักยภาพในการเป็นแบคทีเรียที่ใช้ไนไตรท์ได้

Thesis Title	Use of Molecular Biology Techniques in Studying the Nitrifying Bacteria Community from Shrimp Farming System
Author	Ms. Chanyarat Paungfoo
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2003

Abstract

Aquaculture, especially shrimp farming, has played a major role in the growth of Thailand's economy in recent years, as well as in many South East Asian countries. Accumulation of nitrogenous compounds in aquaculture ponds can be toxic to aquatic animals and causes environmental problems such as eutrophication. The nitrification process is well known, but certain aspects of the microbial ecology of nitrifiers, the microorganisms that convert ammonia to nitrate, is less well understood. In this study, nitrifying bacteria were selected from shrimp farm water and sediment and from commercial seeds. The microbial consortia from each source giving the best ammonia removal during batch culture pre-enrichments were used as inocula for two sequencing batch reactors (SBRs). Nitrifiers were cultivated in the SBRs containing artificial wastewater with 100 mg NH_4-N/l and 25 g/l salinity. Both ammonia and nitrite oxidizing bacteria (AOB and NOB) increased in number over the long-term operation of both SBRs indicated by chemical analysis and most probable number (MPN) technique. The shrimp farm water and sediment seed contained highly efficacious AOB as concluded by their capacity to remove more ammonia by fewer AOB compared to those sourced from a commercial seed. Enrichment of nitrifying bacteria from shrimp farm inoculum in SBR (NFSBR) was studied by molecular methods. Cloning using bacterial specific primers (27f and 1492r) for Bacterial clone library and using AOB specific primers (190f and 1492r) for AOB clone library recovered two clones of Bacterial clone

library and abundant clones of AOB clone library were highly identical to *Nitrosomonas nitrosa* in the *Nitrosomonas communis* cluster. Results from fluorescence *in situ* hybridization (FISH) demonstrated that the abundant AOBs were NSO1225 and/or NSO190 binding cells (21± 2% of all bacteria). The published NOB probes for *Nitrobacter* and *Nitrospira* did not hybridize to any bacterial cells. Therefore, it was anticipated that a novel marine nitrite oxidizing bacteria (NOB) consortium may exist in these saline nitrite-oxidizing enrichments. The biomass from NFSBR was taken, split and subjected to either high or low concentrations of nitrite (HNOBSBR and LNOBSBR), respectively. FISH analysis of the NOB enrichment revealed the absence of *Nitrospira* and only small numbers of *Nitrobacter* cells. It seemed unlikely that the relatively low proportions of detectable NOBs (*Nitrobacter*), in the presence of large unknown bacterial clusters reminiscent of other nitrifying biomasses, were likely to able to achieve the rates of nitrite oxidation observed.

In order to proof the presence of the potential novel nitrite oxidizing bacteria, the three 16S rDNA clone libraries (DNA from NFSBR, LNOBSBR and HNOBSBR) were construction using the new designed *Nitrospira marina* specific primer (SNtsp 1010). The OTU1 was the dominant group of all clone libraries, so it plays an important role of nitrite consumption. The result from BLAST with OTU1 did not give significant homology with any organism, so it could be a novel NOB. However, the sequence of OTU1 did not contain the conserved sequence of 16S rRNA, thus, it was confirm that primer set of 27f and SNtsp1010r amplify a region of DNA that did not belong to 16S rDNA.

The experiment to explore the potential novel NOB was conducted. Only1 isolate (HA1) from 37 presumed single colonies isolated from LNOBSBR and HNOBSBR was matched to OTU1 specific primer (ChanyF and ChanyR), and able to consume 100 mg/l NO_2-N, so it was assumed to be the novel NOB which dominant in all sources. However, the NOB in HA1 have not been able to be further identified and nor has confirmation of the capacity for nitrite oxidation of the isolate possible.