

PHÁT HIỆN KHẢ NĂNG ĐỒNG CHUYỂN HÓA AMMONIUM, NITRITE CỦA CHỦNG NITRATE HÓA DỊ DƯỠNG *Bacillus* sp. TT2 PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Minh^{1,2}, Bùi Hương Giang^{1,2}, Chu Nhật Huy^{1,2}, Hoàng Minh³, Hoàng Phương Hà^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường phổ thông trung học Chuyên Khoa học Tự nhiên

TÓM TẮT

Ammonium và nitrite là hai hợp chất nitrogen vô cơ gây hại cho động vật thủy sản. Phương pháp xử lý ô nhiễm nitrogen thông thường cần sự kết hợp của vi khuẩn nitrate hóa tự dưỡng hiếu khí và vi khuẩn khử nitrate dị dưỡng kỵ khí. Tuy nhiên, vi khuẩn tự dưỡng có tốc độ sinh trưởng chậm và nhu cầu về oxy khác biệt so với nhóm dị dưỡng, gây khó khăn khi áp dụng chúng trong cùng hệ thống xử lý. Trong khi đó, vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng có thể sinh trưởng nhanh, chuyển hóa đồng thời ammonium, nitrite và thích ứng tốt với nhiều điều kiện môi trường, đây là lợi thế để ứng dụng chúng trong xử lý ô nhiễm nitrogen tại đầm nuôi thủy sản. Vì vậy, nghiên cứu này đã sàng lọc được năm chủng vi khuẩn dị dưỡng ký hiệu TT2, TT3, TT6, TT8 và TT9 có thể xử lý ammonium và nitrite đạt hiệu suất trên 95%. Các chủng vi khuẩn này có khả năng tạo màng sinh học tốt và chuyển hóa nitrogen tối ưu khi sinh trưởng trong môi trường chứa nguồn carbon acetate, nồng độ NaCl 0-4%. Thông qua so sánh độ tương đồng của gen 16S rRNA, chủng TT2 được định danh là *Bacillus* sp. TT2. Tính chất đồng chuyển hóa ammonium và nitrite là phát hiện mới về nhóm vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng phân lập tại Việt Nam.

Từ khóa: Ammonium, nitrite, nuôi thủy sản, ô nhiễm nitrogen, vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng khử nitrate hiếu khí.

MỞ ĐẦU

Trong nuôi trồng thủy sản, các hợp chất nitrogen vô cơ gây ô nhiễm như ammonium và nitrite ảnh hưởng rất lớn đến tốc độ sinh trưởng cũng như tỷ lệ sống của vật nuôi khi tồn tại với nồng độ cao. Các nghiên cứu cho đến nay vẫn luôn đề cập đến các vấn đề loại bỏ các hợp chất nitrogen gây ô nhiễm bằng các con đường xử lý sinh học như công nghệ nitrate hóa và khử nitrate. Vi khuẩn tham gia vào quá trình nitrate hóa để chuyển đổi ammonium (NH_4^+) thành nitrite (NO_2^-) chủ yếu thuộc chi *Nitrosomonas*. Tiếp đó, vi khuẩn nitrite hóa thuộc các chi *Nitrobacter* hay *Nitrospina* sẽ oxy hóa nitrite thành nitrate. Quá trình khử nitrate được tiếp diễn trong điều kiện kỵ khí dưới tác động của vi khuẩn khử nitrate dị dưỡng để tạo thành các sản phẩm lần lượt là NO_2 , NO, N_2O và N_2 . Tuy nhiên, sự khác biệt về điều kiện sinh trưởng của 2 nhóm vi khuẩn này là hiếu khí tự dưỡng và kỵ khí dị dưỡng cũng như tốc độ sinh trưởng nhanh của vi khuẩn dị dưỡng dễ tạo ra sự phát triển "lấn át" so với vi khuẩn tự dưỡng, dẫn đến mất cân bằng trong quá trình chuyển hóa các hợp chất nitrogen trong cùng một hệ thống xử lý.

Trong tự nhiên, nhóm vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng cũng được phát hiện trong nguồn nước thải chứa ammonium và carbon hữu cơ. Các chủng vi khuẩn dị dưỡng này không lấy năng lượng cho sinh trưởng từ quá trình oxy hóa các hợp chất chứa nitrogen vô cơ, mà từ nguồn carbon hữu cơ (Robertson *et al.*, 1990). Hiện nay, nhiều chủng vi khuẩn dị dưỡng có khả năng đồng thực hiện quá trình nitrate hóa và khử nitrate hiếu khí (heterotrophic nitrification and aerobic denitrification-HNAD) như các chủng thuộc chi *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Cuprobacter*, *Halomonas*, *Klebsiella marinobacter*, *Pseudomonas* và *Photobacter* được phân lập từ nhiều môi trường khác nhau đã thu hút sự chú ý và nghiên cứu của nhiều nhà khoa học (Fu *et al.*, 2022). Hiệu suất chuyển hóa nitrogen của HNAD tốt hơn so với quy trình thông thường vì có sự khác biệt về sản phẩm trung gian và các enzyme tham gia xúc tác. Khi cung cấp đủ nguồn carbon hữu cơ cho HNAD, chúng có thể phát triển nhanh chóng và thực hiện quá trình nitrate hóa và khử nitrate hiệu quả. Mặc dù nhóm vi khuẩn HNAD này nhìn thấy có tiềm năng ứng dụng thuận lợi trong xử lý ô nhiễm nitrogen vô cơ, nhưng các nghiên cứu về đặc điểm sinh học và tính đa dạng loài của chúng mới chỉ đề cập đến trong môi trường nước ngọt, sự phân lập và đánh giá vai trò của các chủng vi khuẩn HNAD này trong trường nuôi thủy sản nước lợ còn hạn chế và đặc biệt, hướng nghiên cứu về phân lập và ứng dụng nhóm vi khuẩn HNAD này trong xử lý ô nhiễm vẫn còn là vấn đề nghiên cứu mới tại Việt Nam.

Do đó, trong nghiên cứu này, mẫu nước và bùn từ ao nuôi tôm đã được sử dụng làm giàu để phân lập vi khuẩn HNAD. Các thí nghiệm kiểm tra một số đặc tính sinh của các chủng vi khuẩn phân lập sẽ được thực hiện để chứng minh hoạt tính chuyển hóa đồng thời ammonium, nitrite và khả năng thích ứng của chúng khi sinh trưởng trong môi trường nuôi thủy sản nước lợ. Từ đó, mở ra định hướng ứng dụng nhóm vi khuẩn này trong mô hình, công nghệ xử lý nước ô nhiễm các hợp chất nitrogen ngoài thực tế.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu: Mẫu nước và bùn được thu thập tại 5 vị trí khác nhau (bề mặt, giữa và đáy) trong đầm nuôi tôm thẻ chân trắng tỉnh Bạc Liêu vào ngày thứ 55 của vụ nuôi. Các mẫu được bảo quản ở 4°C trong các chai lấy mẫu chuyên dụng và được trộn đều trước khi sử dụng để phân lập vi khuẩn. Môi trường làm giàu, phân lập và nuôi vi khuẩn (VK): Na₂HPO₄ 4,78 g/L; KH₂PO₄ 1,5 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,1 g/L; CH₃COONa 3,416 g/L; vi lượng 1 mL/L (Xia *et al.*, 2020). (Hàm lượng N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃ được bổ sung tùy mục đích thí nghiệm).

Sàng lọc nhóm vi khuẩn HNAD từ môi trường nước nuôi tôm

Mẫu nước nuôi tôm đã thu thập được làm giàu nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrogen bằng cách bổ sung 10% vào môi trường VK chứa 10mg N-NH₄/L, NaCl 15% trong 10 ngày. Việc kiểm tra khả năng chuyển hóa các hợp chất nitrogen vô cơ của các mẫu được thực hiện thông qua xác định hàm lượng của ammonium, nitrite và nitrate có trong môi trường theo từng ngày. Ammonium sẽ được thêm vào môi trường để đạt nồng độ là 10 mgN/L khi 50% lượng ammonium bổ sung ban đầu trong các mẫu đã được oxy hóa thành nitrite và nitrate. Sau khi làm giàu, mẫu được pha loãng rồi tiến hành phân lập trên đĩa thạch chứa môi trường VK trong 3-5 ngày ở 30 ± 2 °C. Khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch được nuôi tách riêng rẽ trên môi trường VK đặc để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá khả năng đồng chuyển hóa ammonium, nitrite của vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được nuôi riêng rẽ trong môi trường VK có bổ sung ammonium hoặc nitrite với nồng độ ban đầu là 5 mgN/L. Sau 3 ngày nuôi lắc ở 130 vòng/phút, thu mẫu dịch nuôi và xác định khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn dựa trên giá trị OD₆₀₀ nm. Nồng độ các hợp chất ammonium, hay nitrite và nitrate trong môi trường dịch được kiểm tra và so sánh với nồng độ ban đầu để xác định hiệu suất chuyển hóa nitơ của từng chủng vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 03 lần. Lựa chọn những chủng vi khuẩn đồng xử lý ammonium và nitrite.

Đánh giá khả năng tạo màng biofilm của các vi khuẩn

Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn lựa chọn theo phương pháp của Morikawa *et al.*, 2006. Khả năng tạo biofilm của vi khuẩn được phát hiện dựa vào sự bắt màu của tím tinh thể trên các ống Eppendorf và định lượng khi đo độ hấp thụ ở bước sóng OD₅₇₀. Giá trị OD₅₇₀ tỉ lệ thuận với khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn.

Đánh giá ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi đến sinh trưởng và khả năng chuyển hóa ammonium của vi khuẩn

Ảnh hưởng của nguồn carbon: Sử dụng lần lượt các nguồn carbon sucrose, glucose, citrate, acetate, succinate với nồng độ 2 g/L bổ sung vào môi trường VK. CaCO₃ 2g/L được coi là nguồn carbon vô cơ cho thí nghiệm đối chứng.

Ảnh hưởng nồng độ NaCl: Bổ sung NaCl với những nồng độ cuối cùng khác nhau: 0; 1; 2; 3 và 4% vào môi trường VK.

Khả năng chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn được xác định thông qua sự giảm của hàm lượng ammonium bổ sung ban đầu (5 mgN/L) sau 3 ngày nuôi lắc ở 130 vòng/phút. Ammonium, nitrite, nitrate được xác định theo phương pháp Nessler, Griss và Salicylate tương ứng. Phương trình đường chuẩn sử dụng để xác định hàm lượng các hợp chất nitrogen là: $y = 0,13 \cdot x + 0,07$ ($R^2 = 0,94$) đối với ammonium; $y = 0,95 \cdot x + 0,11$ ($R^2 = 0,98$) đối với nitrite; $y = 0,12 \cdot x + 0,03$ ($R^2 = 0,97$) đối với nitrate. Bên cạnh đó, khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua giá trị OD₆₀₀. Thí nghiệm được lặp lại 03 lần.

Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn

Mẫu vi khuẩn đã phân lập được tách DNA tổng số và nhân bản đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R. Trình tự đoạn gen 16S rRNA được so sánh độ tương đồng với các trình tự gen được đăng ký trên ngân hàng Genbank để xác định vị trí phân loại của chủng vi khuẩn phân lập.

Xử lý số liệu

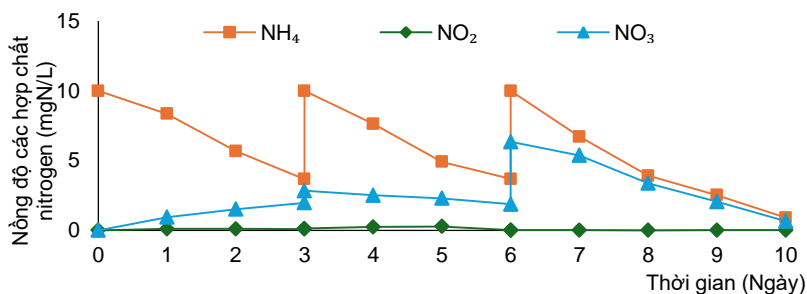
Các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft Office Excel 2022. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình ± Sai số chuẩn. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong mỗi thí nghiệm được xác định thông qua kiểm định Duncan ($p < 0,05$).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập nhóm vi khuẩn HNAD từ mẫu làm giàu

Trong quá trình làm giàu nhóm vi khuẩn HNAD, hàm lượng ammonium bổ sung ban đầu là 10 mg N/L, sau 3 ngày thí nghiệm đã giảm xuống còn 3,67 mgN/L, nitrate trong mẫu tăng lên 1,97 mg N-NO₃/L; bổ sung ammonium để hàm lượng đạt 10 mg N/l. Đến ngày thứ 6, hàm lượng ammonium trong mẫu chỉ ở mức 3,69 mgN-NH₄/L, nhưng lượng nitrite và nitrate trong mẫu chỉ đạt lần lượt 0,02 mgN-NO₂/L và 1,87 mgN-NO₃/L. Việc xuất hiện nitrate trong

mẫu nghiên cứu chứng tỏ đã có sự hình thành nitrite, hàm lượng nitrite này nhỏ hơn rất nhiều so với ammonium có trong mẫu do có sự chuyển tiếp thành nitrate. Bổ sung tiếp ammonium lần 2 để đạt nồng độ ban đầu 10 mg N-NH₄/L, tiếp tục theo dõi đến ngày thứ 10 thì hàm lượng ammonium và nitrate giảm và gần như không phát hiện nitrite trong dịch làm giàu ở ngày thứ 10, lượng nitrite chỉ tăng nhẹ ở mức 0,28 mg N/L ở ngày thứ 4 và 5 (Hình 1).

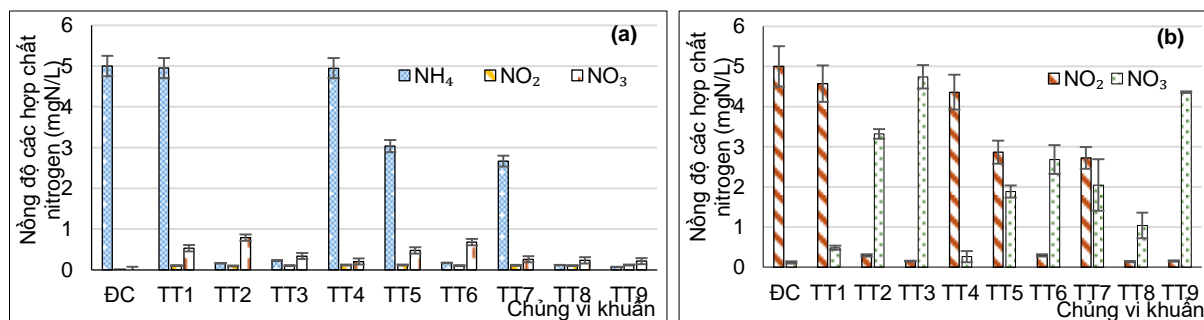


Hình 1. Khả năng chuyển hóa ammonium, nitrite và nitrate của các chủng vi khuẩn được làm giàu

Dựa trên sự biến đổi của hàm lượng các hợp chất ammonium, nitrite và nitrate trong mẫu làm giàu có thể nhận thấy, nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrogen tồn tại trong mẫu đã oxy hóa ammonium tạo thành nitrite và nitrite này tiếp tục chuyển hóa thành nitrate. Sau 10 ngày làm giàu mẫu, nồng độ của cả ba hợp chất đều giảm xuống rất thấp, ammonium và nitrate chỉ đạt khoảng 0,651 mgN/L, còn nitrite hầu như không phát hiện. Chứng tỏ trong môi trường nuôi làm giàu có chứa nhóm vi khuẩn dị dưỡng oxy hóa ammonium, oxy hóa nitrite và cũng có thể có vi khuẩn khử nitrate trong điều kiện hiếu khí. Mẫu dịch sau làm giàu được tiến hành phân lập trên môi trường thạch VK. Sau 3 ngày nuôi ở nhiệt độ 30 °C ± 2, kết quả thu được được 9 chủng vi khuẩn ký hiệu là TT1, TT2, TT3, TT4, TT5, TT6, TT7, TT8, TT9.

Khả năng chuyển hóa các hợp chất nitrogen vô cơ của các chủng vi khuẩn phân lập

Tiến hành thử nghiệm khả năng chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường dịch VK cho thấy, trong cùng một điều kiện nuôi cấy 5 chủng TT2, TT3, TT6, TT8 và TT9 có khả năng chuyển hóa ammonium tốt hơn so với bốn chủng còn lại (Hình 2 a). Với hàm lượng ammonium bổ sung ban đầu là 5mgN/L, chủng TT3 và TT8 đạt hiệu suất xử lý ammonium khoảng 96%, hàm lượng ammonium còn lại trong môi trường lần lượt là 0,23 và 0,17 mgN-NH₄/L. Các chủng TT2, TT6, TT9 cũng thể hiện hoạt tính chuyển hóa ammonium khá tốt với hàm lượng N-NH₄ còn lại đều <0,2 mgN/L. Đặc biệt hơn, lượng nitrite và nitrate tạo thành trong môi trường nuôi của 5 chủng TT2, TT3, TT6, TT8 và TT9 rất thấp, dưới ngưỡng 0,15 mgN/L. Khi nitrite được sử dụng làm nguồn nitrogen chính trong môi trường, các chủng vi khuẩn TT1 và TT4 có khả năng chuyển hóa rất kém. Chủng TT5 và TT7 lại có thể loại bỏ đến 70% lượng nitrite trong môi trường sau 3 ngày nuôi cấy. Hiệu suất loại bỏ nitrite tăng lên đến trên 95% với môi trường chỉ chứa riêng biệt từng vi khuẩn TT2, TT3, TT6, TT8 và TT9 (Hình 2 b). Tuy nhiên, hàm lượng nitrate tạo thành trong môi trường nuôi của vi khuẩn TT2, TT6 và TT8 không cân bằng với hàm lượng nitrite mất đi, điều này gợi ý rằng 3 chủng vi khuẩn này có thể đã thực hiện quá trình khử nitrate/nitrite trong điều kiện hiếu khí. Đây là một tính chất mới về nhóm vi khuẩn dị dưỡng có khả năng chuyển hóa đồng thời các hợp chất ammonium, nitrite và nitrate tại Việt Nam. Trong đó, 5 chủng vi khuẩn TT2, TT3, TT6, TT8, TT9 đã được xác định có khả năng chuyển hóa ammonium và nitrite tốt sẽ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Khả năng chuyển hóa ammonium (a) và nitrite (b) và vô cơ của các chủng vi khuẩn phân lập

Khả năng sinh biofilm của các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitrogen lựa chọn

Vi khuẩn hình thành màng sinh học và thường được bám lên các bề mặt giá thể nhờ sự gắn kết của các polysaccharit ngoại bào giúp bảo vệ vi khuẩn trước những điều kiện môi trường khắc nghiệt. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra hiệu suất xử lý ô nhiễm nitrogen của các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học bám dính trên các giá thể cao hơn so với vi khuẩn ở dạng tự do, Hoiljoki và đồng tác giả (2000) cũng đã chứng minh trong quá trình nitrate

hóa, vi khuẩn nitrate hóa cố định trên giá thể có thể chuyển hóa loại bỏ gần như hoàn toàn các hợp nitrogen trong khi ở dạng tự do chỉ đạt hiệu suất tối đa 61%. Vì vậy, thí nghiệm đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn lựa chọn trong nghiên cứu này được tiến hành.

Bảng 2. Khả năng tạo màng của các chủng vi khuẩn lựa chọn

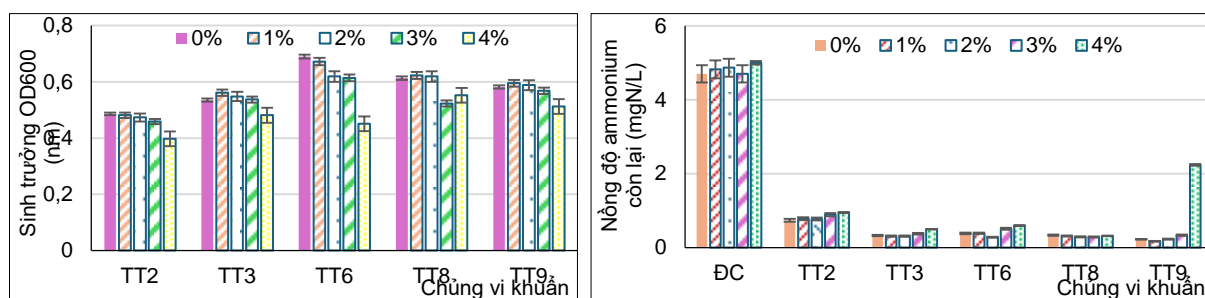
Ký hiệu chủng	Khả năng tạo màng biofilm (OD ₅₇₀ nm)	Khả năng sinh trưởng (OD ₆₀₀ nm)
ĐC	0,21 ^a ± 0,1	0,06 ^a ± 0,1
TT2	1,61 ^{ab} ± 0,1	0,49 ^{ab} ± 0,2
TT3	1,34 ^{ab} ± 0,3	0,57 ^{ab} ± 0,4
TT6	1,23 ^{ab} ± 0,3	0,48 ^{ab} ± 0,9
TT8	2,35 ^{ac} ± 0,1	0,60 ^{ab} ± 0,2
TT9	2,59 ^{ac} ± 0,2	0,56 ^{ab} ± 0,5

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong thí nghiệm, xác định thông qua kiểm định Duncan ($p < 0,05$).

Kết quả thể hiện ở Bảng 2 cho thấy, cả 5 chủng vi khuẩn lựa chọn đều có khả năng tạo màng biofilm, nhưng TT2, TT8 và TT9 có khả năng tạo màng tốt hơn với giá trị mật độ quang đo được ở bước sóng 570 nm lần lượt là 1,61; 2,35 và 2,59, chủng TT3 và TT6 tạo màng kém hơn, giá trị OD₅₇₀ nm đạt lần lượt 1,24 và 1,23 sau 3 ngày nuôi cấy. Đặc điểm tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn nghiên cứu này sẽ tạo điều kiện giúp chúng dễ dàng bám dính/cố định trên các giá thể từ đó tăng hiệu quả và giảm hiện tượng bị rửa trôi khỏi hệ thống xử lý.

Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến sinh trưởng và hoạt tính chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn

Sự sinh trưởng và khả năng chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn đã được thử nghiệm trong môi trường có độ mặn khác nhau từ 0, 1, 2, 3 đến 4%. Kết quả chỉ ra ở Hình 3, các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa NaCl ở nồng độ cao tới 4%, nhưng khả năng phát triển tốt nhất ở nồng độ muối từ 0 - 3%. Trong đó, chủng TT9 cho hoạt tính loại ammonium cao nhất sau 3 ngày thử nghiệm, hàm lượng ammonium còn lại trong mẫu trong khoảng 0,1- 0,2 mg N-NH₄/L, tương ứng với hiệu suất xử lý đạt 96,7%. Nhưng khi nồng độ muối tăng lên 4%, hiệu suất loại ammonium của TT9 bị giảm đi đáng kể, chỉ còn lại 55,2%. Riêng các chủng TT2, TT3, TT6 và TT8 lại có khả năng chuyển hóa ammonium gần như là tương đương giữa các nồng độ muối, chứng tỏ việc thay đổi nồng độ muối thử nghiệm không làm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và hoạt tính xử lý ammonium của các vi khuẩn này, hiệu suất chuyển hóa ammonium của chúng đạt trên 85%. Như vậy, các chủng vi khuẩn phân lập có thể phù hợp để định hướng ứng dụng trong xử lý ô nhiễm nitrogen trong môi trường nước ngọt và nước lợ.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sinh trưởng và hoạt tính chuyển hóa ammonium của vi khuẩn lựa chọn

Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh trưởng và khả năng chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn

Ở các vi khuẩn HNAD, carbon hữu cơ được sử dụng là nguồn cung cấp dinh dưỡng và năng lượng cho sinh trưởng nhưng cũng đóng vai trò làm chất cho điện tử trong quá trình nitrate hóa, khử nitrate. Thông qua quá trình chuyển hóa của chúng để loại bỏ các hợp ô nhiễm khỏi môi trường nước, từ đó giúp chất lượng nước được cải thiện. Tuy nhiên, tốc độ sinh trưởng và hiệu suất xử lý nitrogen của mỗi chủng HNAD sẽ thể hiện khác nhau tùy thuộc vào loại carbon hữu cơ sử dụng (Ren *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, sau 3 ngày nuôi cấy kết quả thể hiện trong Bảng 3 cho thấy, các chủng vi khuẩn thử nghiệm không có khả năng sử dụng nguồn carbon vô cơ (CaCO₃) cho sinh trưởng, giá trị OD₆₀₀ thu được chỉ ở khoảng 0,1. Trong khi đó, nguồn carbon hữu cơ đã kích thích sự sinh trưởng của chúng, thể hiện thông qua giá trị OD₆₀₀ của chủng TT6 và TT9 đạt cao nhất lần lượt là 1,37 và 1,32 khi nguồn carbon glucose được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Như vậy, nguồn carbon hữu cơ đã kích thích sinh trưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu, nhưng chúng có ảnh hưởng đến khả năng chuyển

hóa nitrogen của vi khuẩn hay không cũng là một vấn đề cần được làm rõ. Nên môi trường dịch nuôi vi khuẩn cũng được sử dụng để kiểm tra hàm lượng ammonium còn lại sau 3 ngày nuôi cấy. Tương đồng với kết quả kiểm tra khả năng sinh trưởng, khi môi trường chỉ chứa nguồn carbon vô cơ duy nhất là CaCO₃, hiệu suất chuyển hóa ammonium của vi khuẩn đạt được rất thấp, chỉ đạt mức dưới 30%. Khi môi trường bổ sung nguồn carbon hữu cơ, khả năng chuyển hóa ammonium của vi khuẩn tăng lên đáng kể. Trong đó, chủng TT2 và TT8 có thể xử lý trên 80% hàm lượng ammonium bổ sung ban đầu trong môi trường chứa glucose hay succinate. Trong nghiên cứu này các nguồn carbon hữu cơ sử dụng có sự khác nhau về trọng lượng phân tử và cấu trúc hóa học, đây có thể là yếu tố tác động đáng kể đến quá trình chuyển hóa ammonium của vi khuẩn. Nghiên cứu của Jia và đồng tác giả (2019) gợi ý rằng, các hợp chất cacboxylate như acetate có cấu trúc hóa học đơn giản và trọng lượng phân tử thấp hơn so với các hợp chất cacbohydrate như glucose. Các hợp chất cacboxylate này dễ dàng được vi khuẩn HNAD hấp thụ và sử dụng thông qua chu trình axit tricarboxylic. Do đó, khi acetate được bổ sung trong môi trường đã kích thích tốt hơn khả năng chuyển hóa ammonium của 5 chủng vi khuẩn TT2, TT3, TT6, TT8, TT9 thử nghiệm. Hiệu suất xử lý ammonium của các chủng đạt giá trị cao lần lượt là 98,4; 96; 95; 97,5 và 97,7% trong môi trường bổ sung acetate. Kết quả này khá tương đồng với các nghiên cứu trước đó của nghiên cứu của Duan và đồng tác giả (2015) cũng cho thấy sodium acetate là nguồn carbon tối ưu cho chủng vi khuẩn *V. diabolicus* SF16 khi thực hiện quá trình xử lý nitrogen trong điều kiện hiếu khí. Kết quả này còn thể hiện, mật độ vi khuẩn không tỷ lệ thuận với hoạt tính chuyển hóa nitrogen của chúng. Vì vậy, dựa trên kết quả thu được, acetate được lựa chọn là nguồn carbon phù hợp cho quá trình sinh trưởng và chuyển hóa nitrogen của 5 chủng vi khuẩn tuyển chọn.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh trưởng của nhóm vi khuẩn nitrate hóa

Nguồn carbon	Sinh trưởng (OD ₆₀₀ nm)				
	TT2	TT3	TT6	TT8	TT9
CaCO ₃	0,17 ^a ± 0,7	0,19 ^a ± 0,2	0,09 ^a ± 0,3	0,1 ^a ± 0,2	0,13 ^a ± 0,1
Sucrose	0,89 ^b ± 0,6	0,91 ^b ± 0,4	0,94 ^b ± 0,3	0,65 ^b ± 0,4	0,86 ^b ± 0,3
Glucose	1,28 ^b ± 0,5	1,16 ^b ± 0,3	1,37 ^b ± 0,1	0,98 ^b ± 0,3	1,32 ^b ± 0,5
Citrate	0,91 ^b ± 0,2	1,12 ^b ± 0,1	1,18 ^b ± 0,2	0,87 ^b ± 0,3	1,05 ^b ± 0,2
Acetate	0,95 ^b ± 0,5	0,87 ^b ± 0,8	1,08 ^b ± 0,2	0,79 ^b ± 0,1	0,97 ^b ± 0,3
Succinate	0,91 ^b ± 0,3	0,99 ^b ± 0,4	0,75 ^b ± 0,6	0,78 ^b ± 0,3	0,94 ^b ± 0,1

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong thí nghiệm, xác định thông qua kiểm định Duncan ($p < 0,05$).

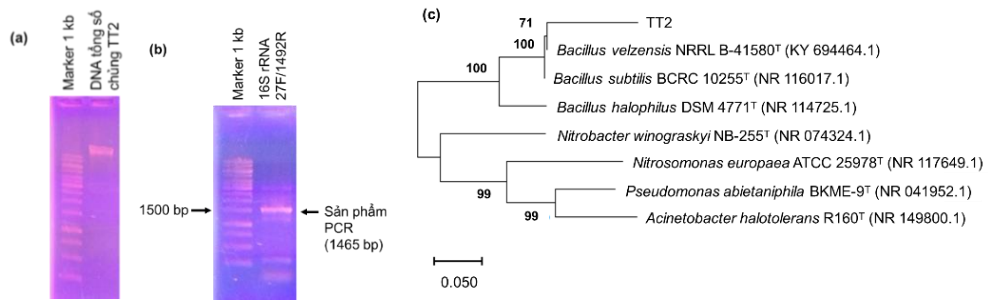
Bảng 4. Khả năng xử lý ammonium của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

Nguồn carbon	Hiệu suất chuyển hóa ammonium (%)				
	TT2	TT3	TT6	TT8	TT9
CaCO ₃	17 ^a ± 0,3	32,4 ^a ± 0,4	29,5 ^a ± 0,5	26 ^a ± 0,2	27,5 ^a ± 0,4
Sucrose	45 ^b ± 0,2	61,8 ^b ± 0,8	72 ^b ± 0,3	69,5 ^b ± 0,5	59,5 ^b ± 0,2
Glucose	87 ^c ± 0,5	75,3 ^c ± 0,1	75,5 ^b ± 0,8	81,3 ^c ± 0,6	68,9 ^c ± 0,4
Citrate	58 ^d ± 0,8	65 ^b ± 0,2	70 ^b ± 0,1	80,8 ^c ± 0,7	54,3 ^b ± 0,7
Acetate	98,4 ^e ± 0,5	96 ^d ± 0,8	95 ^c ± 0,5	97,5 ^d ± 0,5	97,7 ^d ± 0,6
Succinate	70 ^f ± 0,2	62,9 ^b ± 0,5	67,8 ^b ± 0,6	83,6 ^c ± 0,9	71,5 ^c ± 0,8

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong thí nghiệm, xác định thông qua kiểm định Duncan ($p < 0,05$).

Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn

Dựa trên các kết quả nghiên cứu trên, 5 chủng vi khuẩn phân lập đều có hoạt tính chuyển hóa nitrogen tốt, đặc biệt là thể hiện hoạt tính chuyển hóa ammonium và nitrite, đồng thời các chủng TT2, TT6 và TT8 có thể có khả năng khử nitrate/nitrit trong môi trường nuôi cấy. Chủng TT2 được sử dụng để đánh giá vị trí phân loại trước tiên. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy TT2 có độ tương đồng đến 94% với chủng *Bacillus velezensis* C1, *Bacillus amyloliquefaciens*, nên TT2 được định danh là *Bacillus* sp. TT2 với mã số đăng ký trên ngân hàng gen là PP961884 (Hình 4).



Hình 4. Ảnh điện di DNA tổng số (a) và nhân đoạn gen 16S rRNA (b); cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng TT2 (c)

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sàng lọc được 5 chủng vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng có khả năng xử lý đồng thời các hợp chất nitrogen vô cơ ammonium, nitrite đạt hiệu suất trên 95%. Các chủng vi khuẩn này có khả năng tạo màng sinh học tốt và chuyển hóa nitrogen tối ưu khi sinh trưởng trong môi trường chứa nguồn carbon acetate, nồng độ NaCl 0-4%. Chủng vi khuẩn ký hiệu TT2 đã được định danh là *Bacillus* sp. TT2 thông qua so sánh độ tương đồng của trình tự gen 16S rRNA trên Genbank. Đây là phát hiện mới về nhóm vi khuẩn dị dưỡng có khả năng chuyển hóa đồng thời hợp chất ammonium và nitrite phân lập tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi đề tài “Nghiên cứu phát triển chế phẩm vi sinh tích hợp trên vật liệu nổi nhằm tăng hiệu quả xử lý ô nhiễm nitơ trong nuôi thâm canh tôm nước lợ” thuộc Đề án Phát triển công nghệ sinh học ngành nông nghiệp đến năm 2030, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Duan J, Fang H, Su B, Chen J, and Lin J (2015). Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresour Technol*, 179: 421–428.
- Fu W, Song G, Wang Y, Wang Q, Duan P, Liu C, Zhang X and Rao Z (2022). Advances in research into and applications of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying microorganisms. *Front Environ Sci*, 10: 887093.
- Hoilijoki TH, Kettunen RH, and Rintala JA (2000). Nitrification of anaerobically pretreated municipal landfill leachate at low temperature. *Water Research*, 34 (5): 1435-1446.
- Jia Y, Zhou M, Chen Y, Luo J, and Hu Y (2019). Carbon selection for nitrogen degradation pathway by *Stenotrophomonas maltophilia*: Based on the balances of nitrogen, carbon and electron. *Bioresour Technol*, 294: 122114.
- Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S (2006). Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate. *Microbiol*, 152: 2801.
- Ren YX, Yang L, and Liang X (2014). The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. *Bioresour Technol*, 171: 1–9.
- Robertson LA and Kuenen JG (1990). Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57: 139-152.
- Xia L, Li X, Fan W, Wang J (2020). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge. *Bioresour Technol*, 301: 122749.

HETEROTROPHIC NITRIFICATION AND AEROBIC DENITRIFICATION BY A NOVEL *Bacillus* sp. TT2 ISOLATED IN VIETNAM

Nguyen Thi Minh^{1,2}, Bui Huong Giang^{1,2}, Chu Nhat Huy^{1,2}, Hoang Minh³, Hoang Phuong Ha^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*HUS High School for Gifted Students*

SUMMARY

Ammonium and nitrite are two inorganic nitrogen compounds that are harmful to aquatic animals. Conventional nitrogen pollution treatment methods require a combination of aerobic autotrophic nitrifying bacteria and anaerobic heterotrophic denitrifying bacteria. However, autotrophic bacteria have slow growth rates and different oxygen requirements compared to heterotrophic bacteria, making it difficult to apply them in the same treatment system. Meanwhile, heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria can grow quickly, simultaneously metabolize ammonium and nitrite and adapt well to many environmental conditions, which is an advantage for applying them in treating nitrogen pollution in aquaculture system. Therefore, this study has screened five heterotrophic bacterial strains, named as TT2, TT3, TT6, TT8 and TT9 that can treat ammonium and nitrite with an efficiency of over 95%. These bacterial strains able to form bacterial biofilm and has highest nitrogen removal efficiency when grown in an environment containing carbon source acetate, NaCl concentration of 0-4%. Through comparing the similarity of the 16S rRNA gene, strain TT2 was identified as *Bacillus* sp. TT2, representing a new discovery of the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria isolated in Vietnam.

Keywords: Ammonium, aquaculture, heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria, nitrite, nitrogen pollution.

* Author for correspondence: Tel: +84-988754668; Email: hahoangp@gmail.com