



DOI:10.22144/ctujos.2023.217

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN TRONG NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN THỦY SẢN CÓ KHẢ NĂNG HẤP THU VÀ HÓA HƯỚNG ĐỘNG THEO SODIUM TRIPOLYPHOSPHATE

Châu Tú Uyên¹, Nguyễn Văn Qui¹, Võ Phát Tài², Nguyễn Thị Phương Liên³, Huỳnh Đoàn Kiều Anh³ và Nguyễn Thị Phi Oanh^{2*}

¹Học viên ngành Công nghệ Sinh học Khóa 28, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³Sinh viên ngành Sinh học Khóa 45, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): ntpoanh@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 02/07/2023

Sửa bài (Revised): 29/07/2023

Duyệt đăng (Accepted): 03/08/2023

Title: Isolation of bacteria from seafood processing wastewater capable of absorption and chemotaxis towards sodium tripolyphosphate

Author(s): Chau Tu Uyen, Nguyen Van Qui, Vo Phat Tai, Nguyen Thi Phuong Lien, Huynh Doan Kieu Anh and Nguyen Thi Phi Oanh*

Affiliation(s): Can Tho University

TÓM TẮT

Sodium tripolyphosphate (STPP) là chất phụ gia được sử dụng rộng rãi trong chế biến thủy sản. Nồng độ phosphate cao trong nước thải chế biến thủy sản nếu không được xử lý sẽ gây phú dưỡng hóa dẫn đến tảo nở hoa từ đó làm ô nhiễm nguồn nước và ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn trong nước thải chế biến thủy sản có khả năng hấp thu và hóa hướng động theo STPP. Từ các mẫu nước được thu ở hệ thống xử lý nước thải của công ty chế biến thủy sản tại tỉnh Sóc Trăng, 27 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP đã được phân lập, trong đó, 11 dòng vi khuẩn gồm PAE1.1, PAE1.2, PAE1.4, PAE1.6, PAE1.7, PAN1.1, PAN1.12, PAN1.5, POU1.2, POU1.3 và POU1.4 có khả năng tạo sinh khối cao và hấp thu trên 50% STPP ở nồng độ 200 ppm sau 24 giờ nuôi cấy. Ba dòng vi khuẩn POU1.3, POU1.4 và PAN1.12 có khả năng hấp thu cao và hóa hướng động theo STPP được định danh lần lượt là *Acinetobacter* sp. POU1.3, *Acinetobacter* sp. POU1.4 và *Comamonas* sp. PAN1.12 dựa vào kết quả phân tích và so sánh trình tự gen 16S-rRNA.

Từ khóa: *Acinetobacter*, *Comamonas*, hấp thu, hóa hướng động, nước thải chế biến thủy sản, sodium tripolyphosphate

ABSTRACT

Sodium tripolyphosphate (STPP) is an additive widely used in seafood processing. High concentration of phosphate in seafood processing wastewater, if not treated, will cause eutrophication leading to algal blooms, thereby polluting water bodies and affecting public health. This study aimed at the isolation of bacteria in seafood processing wastewater capable of absorption and chemotaxis towards STPP. Twenty-seven bacterial strains able to absorb STPP were isolated from water samples taken at the wastewater treatment system of a seafood processing company in Soc Trang. Eleven strains, PAE1.1, PAE1.2, PAE1.4, PAE1.6, PAE1.7, PAN1.1, PAN1.12, PAN1.5, POU1.2, POU1.3, and POU1.4, showed high biomass growth on and higher than 50% adsorption of STPP (200 ppm) after 24 hours of inoculation. Strains POU1.3, POU1.4, and PAN1.12 showing high absorption and chemotaxis towards STPP were identified as *Acinetobacter* sp. POU1.3, *Acinetobacter* sp. POU1.4, and *Comamonas* sp. PAN1.12 based on 16S-rRNA gene sequence analysis.

Keywords: *Acinetobacter*, absorption, chemotaxis, *Comamonas*, seafood processing wastewater, sodium tripolyphosphate

1. GIỚI THIỆU

Chế biến thủy sản (CBTS) là một trong những ngành công nghiệp đang phát triển của nước ta. Bên cạnh những lợi ích kinh tế mà ngành công nghiệp này mang lại, các loại hóa chất sử dụng trong quá trình CBTS cũng ảnh hưởng đến môi trường nước do nước thải từ quá trình CBTS có nồng độ chất hữu cơ và vô cơ cao.

Đồng bằng sông Cửu Long là vùng nuôi trồng thủy sản lớn của cả nước, phục vụ cho nhu cầu thực phẩm trong nước và xuất khẩu. Sự phát triển của ngành CBTS dẫn đến các chất phụ gia bảo quản thủy sản, trong đó STPP được sử dụng và thải ra môi trường ngày càng nhiều. Nồng độ phosphate trong môi trường nước cao có thể gây phú dưỡng hóa dẫn đến tảo nở hoa từ đó gây chết đói với các động vật thủy sinh và ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Ở người, sử dụng nguồn nước bị nhiễm phosphate có thể gây kích ứng da và niêm mạc. Nồng độ phosphate trong huyết thanh cao gây ra các bệnh lý như suy thận mãn tính hoặc tim mạch có thể dẫn đến tử vong (Carpenter, 2005; Chellappa et al., 2008; Ritz et al., 2012).

Xử lý nước thải CBTS bằng phương pháp sinh học đã và đang được quan tâm nghiên cứu, ứng dụng do hiệu quả và tiết kiệm chi phí đầu tư (Thom và ctv., 2006). Trong môi trường nước, polyphosphate được thủy phân thành orthophosphate (PO_4^{3-}) và được vi khuẩn hấp thu (Ahlgren, 2006). Chính vì vậy, sử dụng vi khuẩn trong tự nhiên, đặc biệt là vi khuẩn bản địa có khả năng hấp thu phosphate để xử lý phosphate trong môi trường nước là phù hợp với xu hướng phát triển bền vững mà thế giới đang hướng tới.

Ở Đồng bằng sông Cửu Long, Vinh và ctv. (2011) đã chứng minh 2 dòng vi khuẩn *Arthrobacter* sp. LV1 và *Bacillus* sp. LV8b được phân lập từ nước thải trang trại bò sữa có khả năng tích lũy phosphate hiệu quả. Khi ứng dụng 2 dòng vi khuẩn này vào xử lý nước thải nhân tạo có hàm lượng PO_4^{3-} từ 9 đến 11 mg/L, dòng *Arthrobacter* sp. LV1 và *Bacillus* sp. LV8b có khả năng làm giảm lượng PO_4^{3-} lần lượt còn 1,11 mg/L và 3,42 mg/L sau 3 ngày xử lý. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về phân lập vi khuẩn từ nước thải CBTS ở khu vực ĐBSCL để xử lý phosphate lưu tồn cao trong nước thải đã được công bố. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập các dòng vi khuẩn bản địa trong nước thải CBTS có khả năng hấp thu và hóa hướng động theo STPP, làm tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp

theo về sử dụng các dòng vi khuẩn này để xử lý STPP trong nước thải từ các nhà máy CBTS.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn trong nước thải chế biến thủy sản có khả năng hấp thu STPP

Các mẫu nước thải CBTS được thu tại hệ thống xử lý nước thải của Công ty chế biến thủy sản Út Xi, tỉnh Sóc Trăng. Các mẫu nước thải được thu bao gồm nước đầu vào, nước bề hiếu khí, nước bề yếm khí và nước đầu ra. Tại mỗi vị trí thu mẫu, tiến hành thu nhiều vị trí và trộn lại thành một mẫu đại diện. Mẫu sau khi thu được bảo quản ở 4°C khi chuyển về phòng thí nghiệm. Vi khuẩn hấp thu STPP trong nước thải được phân lập như sau: Cho 5 mL mẫu nước thải vào bình tam giác 100 mL chứa 45 mL môi trường khoáng tối thiểu (MM) đã khử trùng gồm 0,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 98,5 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,75 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,2 mg Na_2EDTA , 2,75 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,7 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,16 mg H_3BO_3 , 1,15 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,24 mg CuSO_4 , 0,24 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg MoO_3 , 1000 mL nước cất, pH = $7 \pm 0,2$. Môi trường MM được bổ sung 0,1 g/L STPP (Việt Nam) và 3,68 g/L sodium acetate (Trung Quốc) đã khử trùng. Mẫu được lắc 200 vòng/phút trên máy lắc tròn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (30°C - 32°C). Sau một tuần nuôi cấy, dung dịch huyền phù vi khuẩn (5 mL) được chuyển sang bình tam giác 100 mL có chứa 45 mL môi trường MM mới có bổ sung STPP và sodium acetate. Mẫu được nuôi trong điều kiện tương tự như trên. Quy trình chuyển mẫu và nuôi cấy được lặp lại 3 lần liên tiếp. Các mẫu đã được làm giàu mật số vi khuẩn sau 3 lần chuyển mẫu và nuôi cấy được để yên 30 phút, pha loãng dung dịch huyền phù vi khuẩn đến 10^{-5} . Sau đó, 100 μL dịch huyền phù vi khuẩn của từng độ pha loãng được hút và trải lên môi trường MM đặc (1,5% agar) có bổ sung STPP và sodium acetate với nồng độ như trên. Vi khuẩn được ủ ở 32°C. Sau 7 ngày, chọn những khuẩn lạc rời rạc, khác nhau về hình thái để phân lập bằng phương pháp cấy rìa trên môi trường MM đặc có bổ sung STPP và sodium acetate. Các khuẩn lạc tiếp tục được cấy rìa để phân lập thuần trên môi trường Tryptone soya agar (TSA, Ấn Độ, 10 g/L tryptone soya broth, 15 g/L agar). Sau đó, các dòng vi khuẩn được ghi nhận đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA (Oanh & Triêu, 2017).

2.2. Khảo sát sự tăng trưởng và hấp thu STPP của vi khuẩn

Chung một khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường TSA vào môi trường Tryptone soya broth (TSB, Ấn Độ, 30 g/L).

Vi khuẩn được nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ. Mật độ quang (OD_{600nm}) của các dung dịch huyền phù vi khuẩn được kiểm tra và điều chỉnh về cùng giá trị $OD_{600nm} = 0,7$. Sau đó, 40 μ L dung dịch huyền phù của từng dòng vi khuẩn được chủng vào ống nghiệm có chứa 4 mL môi trường MM được bổ sung sodium acetate và STPP ở các nồng độ 50, 100 và 200 ppm. Hai nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự gồm (i) có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung STPP và (ii) không chủng vi khuẩn nhưng có bổ sung STPP. Vi khuẩn được nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau 24 giờ nuôi cấy, mật độ quang (OD_{600nm}) của các dung dịch huyền phù vi khuẩn được kiểm tra và hàm lượng STPP còn lại trong mẫu được xác định.

STPP được định lượng bằng phương pháp so màu khi tạo phức với Molybdate blue ở bước sóng 820 nm (Chaudhry & Nautiyal, 2011 có hiệu chỉnh). Phương trình đường chuẩn có dạng $y = 99,22x - 5,05$ ($R^2 = 0,9995$), trong đó, y là độ hấp thụ quang ở bước sóng 820 nm, x là hàm lượng STPP.

Hàm lượng STPP còn lại trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn được xác định như sau: Cho 500 μ L dung dịch huyền phù của từng dòng vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung sodium acetate và STPP vào ống eppendorf và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tế bào vi khuẩn. Một trăm μ L dung dịch sau ly tâm được chuyển vào ống eppendorf mới và bổ sung 100 μ L dung dịch HCl 2N. Hỗn hợp được ủ ở 95°C trong 30 phút. Hỗn hợp được bổ sung 500 μ L Molybdate blue và 1 mL nước cất. Mẫu tiếp tục được ủ ở 95°C trong 30 phút. Sau đó, độ hấp thụ quang của dung dịch được đo ở bước sóng 820 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis (Multiskan GO, Phần Lan).

2.3. Khảo sát khả năng hóa hướng động theo STPP của vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP hiệu quả từ kết quả của Mục 2.2 được tuyển chọn cho thí nghiệm này. Khả năng hóa hướng động của vi khuẩn được khảo sát theo phương pháp của Parales and Harwood (2002). Đặt giấy lọc Whatman hình tròn có đường kính 2 cm đã khử trùng vào đĩa Petri có chứa môi trường khoáng tối thiểu bán đặc (0,3% agar) có bổ sung sodium acetate. STPP được rắc xung quanh đĩa giấy lọc và sau đó bỏ giấy lọc ra khỏi đĩa Petri. Dùng đầu nhọn của tăm tre đã khử

trùng chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường TSA vào tâm vòng STPP vừa rắc, mẫu được ủ ở 32°C. Theo dõi sự tạo thành sinh khối vi khuẩn trong 7 ngày. Vi khuẩn có khả năng hóa hướng động theo STPP sẽ tạo sinh khối theo hướng có bổ sung STPP. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

2.4. Định danh khoa học các dòng vi khuẩn tiềm năng

Các dòng vi khuẩn vừa có khả năng hấp thu STPP hiệu quả vừa có khả năng hóa hướng động theo STPP được tuyển chọn để giải trình tự gen 16S-rRNA. DNA của vi khuẩn được ly trích dựa theo quy trình trích DNA của Sambrook et al. (1989). Trình tự gen 16S-rRNA của các dòng vi khuẩn tiềm năng được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTAACGACT-3') (Wilmotte et al., 1993). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm 95°C (6 phút), 40 chu kỳ nhân số lượng DNA với nhiệt độ và thời gian tương ứng là 5°C (30 giây), 55°C (30 giây), 72°C (30 giây) và 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1,5% và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger (Sanger et al., 1977). Mức độ tương đồng về trình tự gen 16S-rRNA của các dòng vi khuẩn nghiên cứu được so sánh với các dòng vi khuẩn đã công bố trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BlastN.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

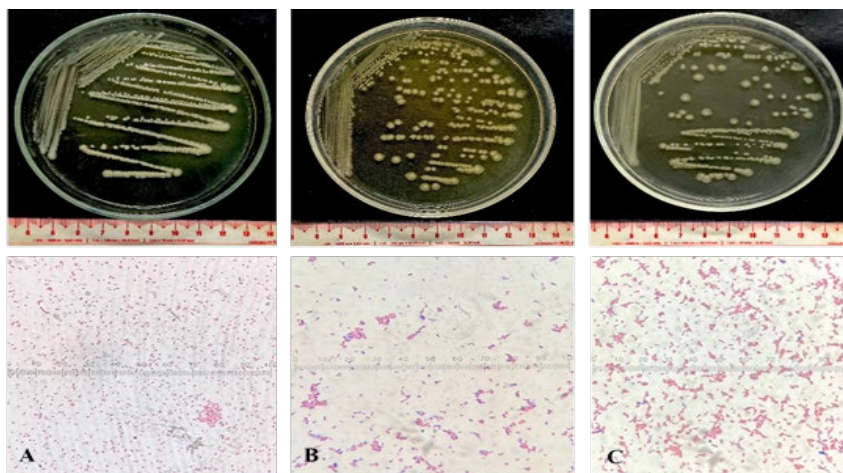
3.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP

Từ các mẫu nước thải chế biến thủy sản được thu tại Công ty chế biến thủy sản Út Xi, tỉnh Sóc Trăng, 27 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP đã được phân lập. Về hình thái, các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn hoặc không đều; màu trắng, vàng hoặc hồng; bìa nguyên, chia thùy hoặc răng cưa; độ nổi lồi, phẳng hoặc mô; bề mặt trơn; kích thước khuẩn lạc trong khoảng 1 - 11 mm. Về đặc điểm tế bào, đa số tế bào vi khuẩn có hình cầu, một số có hình que, kích thước trong khoảng 0,5 - 1 μ m. Trong 27 dòng vi khuẩn phân lập, 19 dòng là vi khuẩn Gram âm và 8 dòng là vi khuẩn Gram dương. Đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn phân lập được trình bày trong Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của một số dòng vi khuẩn đại diện được minh họa ở Hình 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 27 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP đã phân lập

TT	Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc				Đặc điểm tế bào			
		Hình dạng	Màu sắc	Bia	Độ nổi	Kích thước (mm)	Hình dạng	Kích thước (µm)	Gram
1	PIN1.1	tròn	trắng đục	nguyên	lài	1,5	cầu	0,5	+
2	PIN1.2	tròn	trắng đục	nguyên	lài	3	cầu	0,5	-
3	PIN1.5	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	3,5	que	1x0,5	+
4	PIN1.6	tròn	vàng	nguyên	lài	2,5	cầu	0,5	+
5	PIN1.7	tròn	trắng	nguyên	lài	4	cầu	1	-
6	PAE1.1	tròn	hồng	nguyên	phẳng	1	que	1x0,5	-
7	PAE1.2	tròn	hồng	nguyên	phẳng	1	cầu	1	+
8	PAE1.4	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	5x2	que	1x0,5	-
9	PAE1.5	tròn	trắng đục	nguyên	mô	3	cầu	0,5	-
10	PAE1.6	tròn	trắng ngà	răng cưa	lài	6	cầu	1	+
11	PAE1.7	tròn	trắng đục	nguyên	lài	4	que	1x0,5	-
12	PAN1.1	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	3	cầu	1,5	+
13	PAN1.12	tròn	trắng	nguyên	lài	1	que	1,5x1	-
14	PAN1.2	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	2	cầu	0,5	-
15	PAN1.3	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	3	cầu	1	-
16	PAN1.4	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	6x4	cầu	0,5	-
17	PAN1.5	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	6x4	que	1x0,5	-
18	PAN1.6	tròn	trắng ngà	răng cưa	lài	2	cầu	1	-
19	PAN1.7	tròn	hồng	nguyên	mô	1,5	cầu	0,5	-
20	PAN1.8	tròn	trắng	nguyên	lài	5	que	1x0,5	-
21	PAN1.9	tròn	trắng ngà	nguyên	mô	5	cầu	1	-
22	POU1.1	tròn	trắng ngà	răng cưa	lài	11	cầu	1	+
23	POU1.2	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	1,5	cầu	0,5	-
24	POU1.3	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	5	cầu	1	-
25	POU1.4	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	4	cầu	1	-
26	POU1.5	tròn	trắng đục	nguyên	lài	6	que	1x0,5	-
27	POU1.6	tròn	trắng	nguyên	lài	1	cầu	1	+

Ghi chú: PIN, PAE, PAN và POU: vi khuẩn được phân lập từ nước đầu vào, nước bề hiếu khí, nước bề yếm khí và nước đầu ra, theo thứ tự.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào (quan sát dưới kính hiển vi Olympus, độ phóng đại 1000X) của 3 dòng khuẩn đại diện khi được nuôi cấy 3 ngày trên môi trường TSA

Ghi chú: A: dòng PAN1.12; B: dòng POU1.3; C: dòng POU1.4

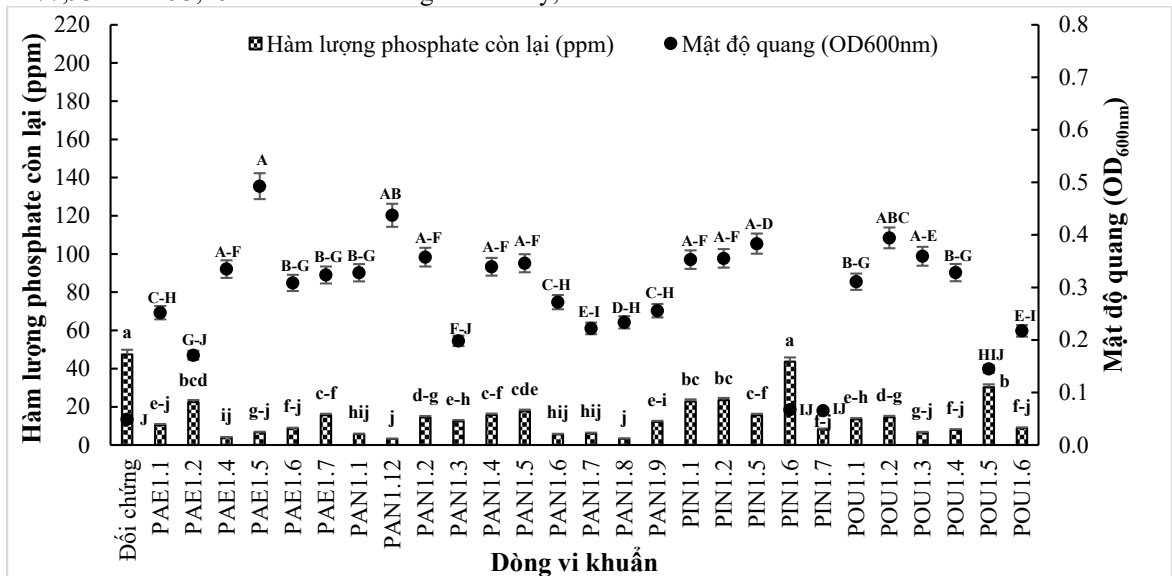
3.2. Khả năng tăng trưởng và hấp thu STPP của vi khuẩn

Kết quả khảo sát cho thấy có sự khác biệt về khả năng tăng trưởng và hấp thu STPP giữa các dòng vi khuẩn khi được nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 3,68 g/L sodium acetate và STPP với các nồng độ 50 ppm, 100 ppm và 200 ppm ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy.

Khi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 50 ppm STPP, 4/27 dòng vi khuẩn tăng trưởng tạo sinh khối cao nhất lần lượt là PAE1.5, PAN1.12, POU1.2 và PIN1.5 thông qua giá trị OD_{600nm} từ 0,38 đến 0,49, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung STPP ($P < 0,05$). Kết quả khảo sát khả năng hấp thu STPP cho thấy 13/27 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP cao ở nồng độ 50 ppm gồm PAE1.1, PAE1.4, PAE1.5, PAE1.6, PAN1.1, PAN1.12, PAN1.6, PAN1.7, PAN1.8, PIN1.7, POU1.3, POU1.4 và POU1.6 với hiệu suất hấp thu từ 77,93% đến 93,28% ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy,

khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn và so với các dòng vi khuẩn còn lại ($P < 0,05$). Trong đó, 3 dòng vi khuẩn PAN1.12, PAN1.8 và PAE1.4 có hiệu suất hấp thu STPP trên 90% ở nồng độ 50 ppm tại thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Trong số 3 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng hấp phụ STPP cao, dòng PAN1.12 vừa có khả năng tăng trưởng cao ($OD_{600nm} = 0,44$) và vừa có hiệu suất hấp thu STPP cao, đạt 93,28%.

Kết quả định lượng phosphate cho thấy các dòng vi khuẩn hấp thu STPP cao bao gồm 2 dòng tạo sinh khối cao PAE1.5 và PAN1.12 (OD_{600nm} lần lượt là 0,49 và 0,44) và các dòng tạo sinh khối trung bình (OD_{600nm} trong khoảng từ 0,15 đến 0,39). Các dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP kém là những dòng có sinh khối thấp (OD_{600nm} trong khoảng từ 0,07 đến 0,11). Tuy nhiên, dòng POU1.5 có sinh khối vi khuẩn đạt mức trung bình nhưng khả năng hấp thu STPP tương đối thấp (36,31%), ngược lại, dòng PIN1.7 có sinh khối vi khuẩn thấp nhất nhưng khả năng hấp thu STPP rất cao (82,73%) (Hình 2).



Hình 2. Khả năng tăng trưởng và hấp thu STPP (50 ppm) của 27 dòng vi khuẩn phân lập ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy

Ghi chú: Các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$).

Khi được nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 100 ppm STPP, dòng vi khuẩn PAN1.1 tạo sinh khối cao nhất, với giá trị mật độ quang đạt 0,55, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung STPP ($P < 0,05$) và với đa số các dòng vi khuẩn còn lại. Kết quả khảo sát khả năng hấp thu STPP cho thấy 15/27 dòng vi khuẩn hấp thu STPP cao, đạt hiệu suất trên 60%, khác biệt có ý nghĩa

thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn và so với các dòng vi khuẩn còn lại. Dòng POU1.4 và dòng PAN1.4 có cùng giá trị mật độ quang ($OD_{600nm} = 0,43$), tuy nhiên khả năng hấp thu STPP của dòng POU1.4 cao hơn (79,08%) so với dòng PAN1.4 (54,76%) ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy.

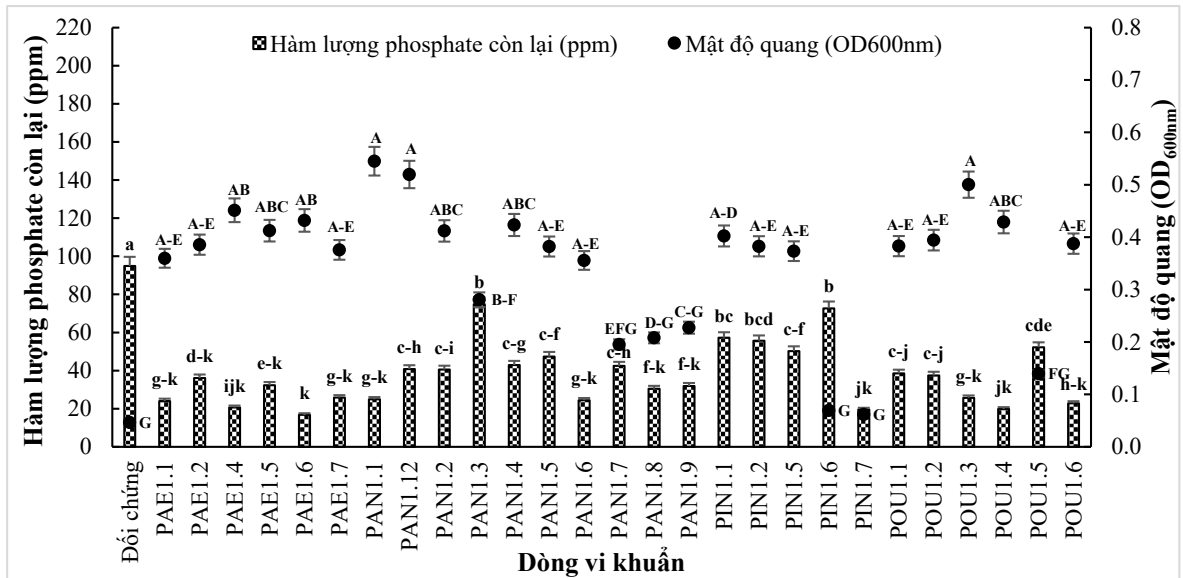
Kết quả khảo sát ở nồng độ STPP 100 ppm cũng cho thấy các dòng vi khuẩn hấp thu STPP cao gồm

các dòng tạo sinh khối cao (OD_{600nm} trong khoảng 0,21 - 0,55). Các dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP thấp là các dòng có sinh khối thấp, ngoại trừ dòng PIN1.7, mặc dù sinh khối thấp nhất nhưng khả năng hấp thu STPP đạt 79,41% ở nồng độ 100 ppm (Hình 3).

Khi được nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 200 ppm STPP, dòng vi khuẩn tăng trưởng tạo sinh khối cao nhất là PAE1.7 với giá trị mật độ quang đạt 0,59, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung STPP và với đa số các dòng vi khuẩn còn lại. Kết quả khảo sát khả năng hấp thu

STPP của 27 dòng vi khuẩn thử nghiệm cho thấy 11/27 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP trên 50% ở nồng độ 200 ppm, khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05) khi so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn và so với đa số các dòng vi khuẩn còn lại (Hình 4).

Như vậy, ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung sodium acetate và STPP với các nồng độ 50 ppm, 100 ppm và 200 ppm, 11 dòng PAE1.4, PAE1.5, PAN1.12, PAN1.2, PAN1.4, PAN1.5, PIN1.1, PIN1.2, PIN1.5, POU1.2 và POU1.3 vẫn tạo sinh khối cao ở 3 nồng độ khảo sát.

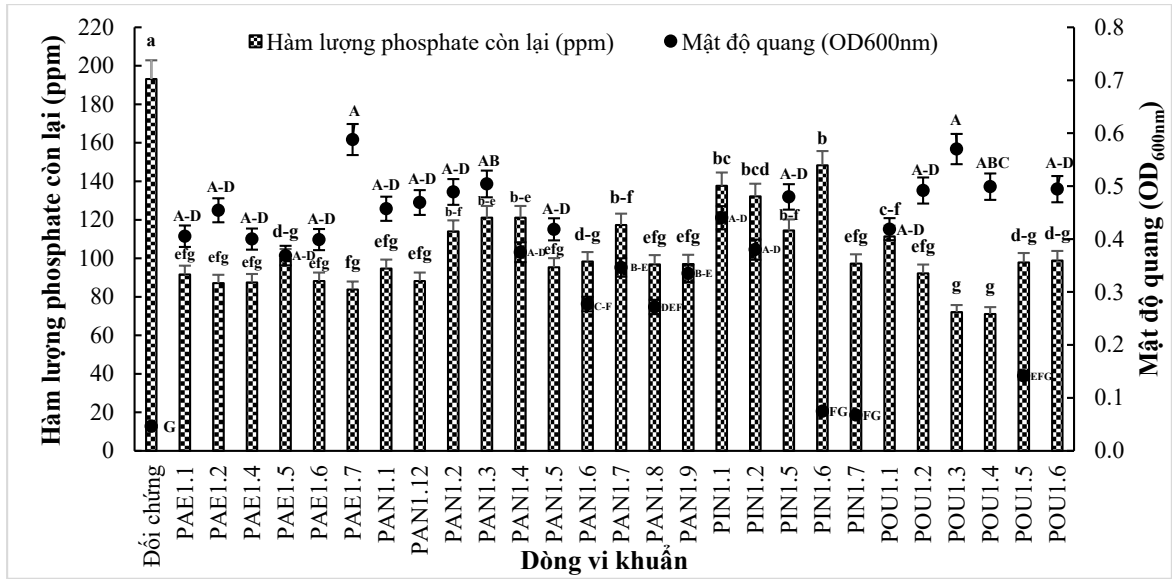


Hình 3. Khả năng tăng trưởng và hấp thu STPP (100 ppm) của 27 dòng vi khuẩn phân lập ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy

Ghi chú: Các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (P<0,05).

Trong số 27 dòng vi khuẩn phân lập, 11 dòng gồm PAE1.1, PAE1.2, PAE1.4, PAE1.6, PAE1.7, PAN1.1, PAN1.12, PAN1.5, POU1.2, POU1.3 và POU1.4 có khả năng hấp thu STPP cao ở cả 3 nồng độ khảo sát nên các dòng vi khuẩn này được tuyển chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Usharani et al. (2011) phân lập vi khuẩn tích lũy polyphosphate trong các mẫu nước bị ô nhiễm và mẫu đất rừng cho thấy dòng *Bacillus* sp. RS-1, *Pseudomonas* sp. YLW-7 và *Enterobacter* sp. KLV-2 có hiệu suất hấp thu phosphate cao. Hiệu suất hấp thu phosphate khác nhau tùy vào môi trường nuôi cấy và sử dụng các dòng vi khuẩn riêng lẻ hoặc kết hợp. Khả năng hấp thu phosphate trong môi trường khoáng tối thiểu của dòng *Pseudomonas* sp. YLW-7 đạt 68% sau 72 giờ. Khi nuôi cấy kết hợp 3 dòng *Bacillus* sp. RS-1, *Pseudomonas* sp. YLW-7 và *Enterobacter* sp.

KLV-2 thì hiệu suất hấp thu đạt 92,5% sau 72 giờ. Trong môi trường có bổ sung 100 mg/L phosphate và lactose thì hiệu suất hấp thu phosphate cao nhất, đạt 63,4% khi sử dụng cả 3 dòng và đạt 52,3% khi sử dụng dòng *Pseudomonas* sp. YLW-7 sau 72 giờ. Theo Benammar et al. (2015), khi được nuôi cấy với hàm lượng phosphate là 5, 10, 30 và 50 ppm, hiệu suất hấp thu phosphate của vi sinh vật trong bùn hoạt tính đều lớn hơn 70%, tuy nhiên, khi nồng độ phosphate tăng thì hiệu suất hấp thu giảm. Trong nghiên cứu này, đa số các dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP cao ở nồng độ 50 ppm, khi tăng nồng độ STPP đến 100 ppm và 200 ppm, hiệu suất hấp thu STPP của các dòng vi khuẩn đều giảm, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Benammar et al. (2015).



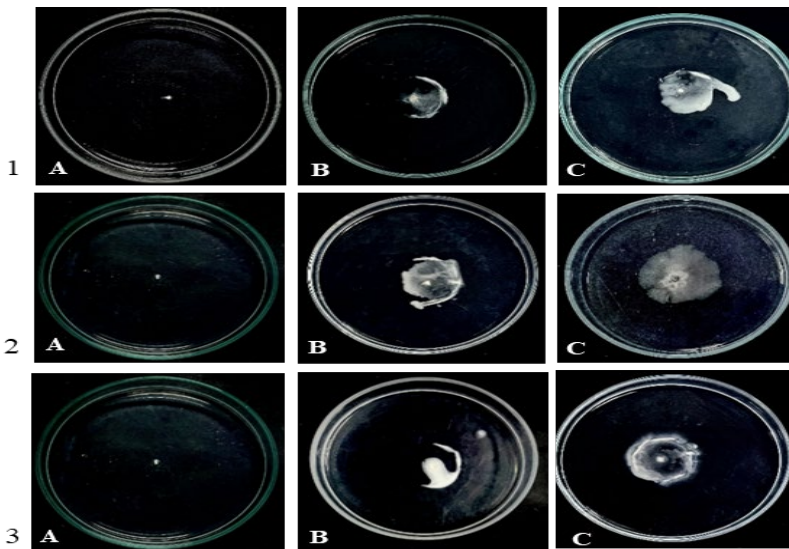
Hình 4. Khả năng tăng trưởng và hấp thu STPP (200 ppm) của vi khuẩn ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy

Ghi chú: Các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$).

3.3. Khả năng hóa hướng động theo STPP của 11 dòng vi khuẩn tuyển chọn

Mười một dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP trên 50% trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 200 ppm STPP và 3,68 g/L sodium acetate được khảo sát khả năng hóa hướng động theo STPP. Kết quả khảo sát cho thấy 3 dòng vi khuẩn POU1.3, POU1.4 và PAN1.12 thể hiện khả năng hóa hướng động theo STPP. Cả 3 dòng vi khuẩn đều

tạo sinh khối trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung sodium acetate với sự hiện diện của STPP. Khi STPP được bổ sung ở nửa vòng tròn, cả 3 dòng vi khuẩn này đều phát triển sinh khối theo hướng có STPP và ít di chuyển về phía còn lại (Hình 5B). Khi STPP được bổ sung ở cả vòng tròn, 3 dòng vi khuẩn này phát triển sinh khối theo hướng từ tâm vòng tròn về phía có STPP (Hình 5C). Ngược lại, trong môi trường không bổ sung STPP, vi khuẩn chỉ tạo ít sinh khối ngay vị trí chủng ban đầu (Hình 5A).



Hình 5. Đặc tính hóa hướng động của 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn POU1.3 (1), POU1.4 (2) và PAN1.12 (3) theo STPP ở thời điểm 72 giờ nuôi cấy

Ghi chú: A: Không bổ sung STPP, B: STPP được bổ sung nửa vòng tròn, C: STPP được bổ sung cả vòng tròn

Hóa hướng động theo hợp chất hóa học là đặc điểm thuận lợi và là khả năng quan trọng của vi khuẩn giúp chúng tìm nguồn dinh dưỡng, tránh các điều kiện bất lợi của môi trường hoặc tương tác với môi trường xung quanh. Vi khuẩn có khả năng phân hủy và hóa hướng động theo một hợp chất nào đó cho phép chúng tìm đến và phân hủy hợp chất đó trong môi trường xung quanh ngay cả khi nồng độ của hợp chất rất thấp. Ngoài ra, vi khuẩn cũng có khả năng di chuyển để tránh những chất độc hại, giúp chúng tìm điều kiện phù hợp để tồn tại và phát triển (Pandey & Jain, 2002). Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy vi khuẩn có khả năng phân hủy một hợp chất nào đó cũng có khả năng hóa hướng động theo hợp chất đó. Theo nghiên cứu của Nhân và ctv. (2021), dòng vi khuẩn GS38 được phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu nhớt ở nội ô thành phố Cần Thơ có khả năng phân hủy dầu nhớt và di chuyển theo dầu nhớt. Bên cạnh đó, dòng vi khuẩn *Pseudomonas putida* G7 có khả năng phân hủy phenanthrene cũng được chứng minh có đặc tính hóa hướng động theo hydrocarbon đa vòng thơm này (Grimm & Harwood, 1997). Trong nghiên cứu này, 3 dòng vi khuẩn PAN1.12, POU1.3 và POU1.4 vừa có khả năng hấp thu STPP cao vừa hóa hướng động theo STPP nên được xem là những dòng vi khuẩn tiềm năng được tuyển chọn để xác định tên khoa học.

3.4. Định danh ba dòng vi khuẩn tiềm năng

Kết quả phân tích cho thấy hai dòng vi khuẩn POU1.3 và POU1.4 đều có trình tự gen 16S-rRNA tương đồng 99,85% với loài *Acinetobacter junii* nên cả 2 dòng này được định danh lần lượt là *Acinetobacter* sp. POU1.3 và *Acinetobacter* sp. POU1.4. Tương tự, dòng PAN1.12 có trình tự gen 16S-rRNA tương đồng 99,89% với loài *Comamonas thiooxydans* nên được định danh là *Comamonas* sp. PAN1.12.

Theo Van Veen et al. (1994), *Acinetobacter johnsonii* có khả năng hấp thu lượng lớn polyphosphate qua màng tế bào. Hơn nữa, *Acinetobacter* cũng đã được xác định là nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế trong các vi khuẩn tích lũy phosphorus (Fuhs & Chen, 1975; Buchan, 1983). Theo nghiên cứu của Điệp và Lực (2014), dòng vi khuẩn HP3.2 được phân lập từ nước rỉ rác có khả năng tích lũy polyphosphate cao và có độ tương đồng của gen 16S-rRNA 99% với loài *Acinetobacter soli*. Ngoài ra, các dòng vi khuẩn thuộc chi *Acinetobacter*

cũng được chứng minh có khả năng phân hủy các hợp chất gây ô nhiễm khác, chẳng hạn, dòng vi khuẩn *Acinetobacter johnsonii* FZ-5 có khả năng phân hủy 4-hydroxybenzoic acid (2 g/L) trong 72 giờ với hiệu suất phân hủy đạt 71,04% (Lu et al., 2021), *Acinetobacter johnsonii* có khả năng phân hủy hoàn toàn naphthalene (2 g/L) và phenanthrene (600 mg/L) (Jiang et al., 2020).

Các dòng vi khuẩn thuộc chi *Comamonas* cũng được xác định có khả năng hấp thu các hợp chất gây ô nhiễm môi trường. Trong các dòng vi khuẩn được phân lập từ nguồn nước thải công nghiệp nhiễm kim loại nặng, *Comamonas* sp. đã được phân lập và xác định có khả năng hấp thu 15,92% cadmium và 30,05% thủy ngân trong 24 giờ (Qurbani & Hamzah, 2021). Dòng vi khuẩn *Comamonas odontotermitis* P2 được phân lập từ đất ruộng nhiễm glyphosate có khả năng hấp thu glyphosate (1,5 g/L) trong 104 giờ (Firdous et al., 2020). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về vi khuẩn hấp thu phosphate thuộc chi *Comamonas* đã được công bố. Như vậy, kết quả nghiên cứu này bổ sung thông tin về vi khuẩn có khả năng hấp thu phosphate thuộc chi *Comamonas*.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu nước được thu tại Công ty chế biến thủy sản Út Xi, tỉnh Sóc Trăng, 27 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu STPP đã được phân lập, trong đó, ba dòng vi khuẩn POU1.3, POU1.4 và PAN1.12 có khả năng hấp thu STPP hiệu quả nhất, đồng thời có khả năng hóa hướng động theo STPP. Kết quả phân tích và so sánh trình tự gen 16S-rRNA của 3 dòng vi khuẩn cho thấy dòng POU1.3, POU1.4 và dòng PAN1.12 được định danh lần lượt là *Acinetobacter* sp. POU1.3, *Acinetobacter* sp. POU1.4 và *Comamonas* sp. PAN1.12. Các dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu hiệu quả và hóa hướng động theo STPP sẽ làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm xử lý phosphate trong nước thải CBTS nói riêng cũng như các nguồn nước thải khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài Khoa học và Công nghệ tỉnh Sóc Trăng: Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân hủy chất phụ gia sodium tripolyphosphate (STPP) và nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh xử lý STPP trong nước thải từ công ty chế biến thủy sản ở tỉnh Sóc Trăng, mã số đề tài DP2022-08.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahlgren, J. (2006). Organic phosphorus compounds in aquatic sediments: analysis, abundance and effects. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital comprehensive Summaries of Uppsala. *Dissertations from the faculty of science and technology*, 160, 55.
- Benammar, L., Menasria, T., Ayachi, A., & Benounis, M. (2015). Phosphate removal using aerobic bacterial consortium and pure cultures isolated from activated sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, 95, 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2015.03.011>
- Buchan, L. (1983). Possible mechanism of biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*, Vol 15, 87-103. <https://doi.org/10.2166/wst.1983.0109>
- Carpenter, S. R. (2005). Eutrophication of aquatic ecosystems: bistability and soil phosphorus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(29), 10002-10005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503959102>
- Chaudhry, V., & Nautiyal, C. S. (2011). A high throughput method and culture medium for rapid screening of phosphate accumulating microorganisms. *Bioresource Technology*, 102(17), 8057-8062. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.045>
- Chellappa, N. T., Borba, J. M., & Rocha, O. (2008). Phytoplankton community and physical-chemical characteristics of water in the public reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68, 477-494. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000300004>
- Diệp, C. N., & Lược, Đ. T. (2014). Phân lập, tuyển chọn và ứng dụng vi khuẩn chuyển hoá nitơ và photpho từ bã rác để xử lý N và P trong nước rỉ rác. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (33), 117-124.
- Firdous, S., Iqbal, S., & Anwar, S. (2020). Optimization and modeling of glyphosate biodegradation by a novel *Comamonas odontotermitis* P2 through response surface methodology. *Pedosphere*, 30(5), 618-627. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60381-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60381-3)
- Fuhs, G. W., & Chen, M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbial Ecology*, 2(2), 119-138. <https://doi.org/10.1007/BF02010434>
- Grimm, A. C., & Harwood, C. S. (1997). Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 4111-4115. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.4111-4115.1997>
- Jiang, Y., Qi, H., & Zhang, X. M. (2020). Co-biodegradation of naphthalene and phenanthrene by *Acinetobacter johnsonii*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 40(2), 422-431. <https://doi.org/10.1080/10406638.2018.1441881>
- Lu, P., Huang, H., Sun, Y., Qiang, M., Zhu, Y., Cao, M., Peng, X., Yuan, B., & Feng, Z. (2021). Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Acinetobacter johnsonii* FZ-5 and *Klebsiella oxytoca* FZ-8 under anaerobic conditions. *Biodegradation*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09963-w>
- Nhân, L. H., & Oanh, N. T. P. (2021). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy và hóa hướng động theo dầu nhớt. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57(1), 35-44. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.006>
- Oanh, N. T. P., & Triệu, N. V. B. (2017). Phân lập vi khuẩn phân hủy xylene từ hệ thống xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (52), 99-103. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.115>
- Pandey, G., & Jain, R. K. (2002). Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 12(68), 5789-5795. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5789-5795.2002>
- Parales, R. E., & Harwood, C. S. (2002). Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 266-273. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00320-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00320-X)
- Qurbani, K., & Hamzah, H. (2021). Heavy metal tolerant *Comamonas* species isolated from soil sample in Tanjaro region of Sulaymaniyah city-Iraq. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(5), 5068-5074.
- Ritz, E., Hahn, K., Ketteler, M., Kuhlmann, M. K., & Mann, J. (2012). Phosphate additives in food-a health risk. *Deutsches Ärzteblatt International*, 109(4), 49. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0049>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

- Thom, C. T., Lại, P. T., & Tó, N. V. (2006). *Cải tạo môi trường bằng chế phẩm vi sinh vật*. Nhà xuất bản Lao Động.
- Usharani, K., Muthuchamy, M., & Perumalsamy, L. (2011). Biological removal of phosphate from synthetic wastewater using bacteria consortium. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(1), 37-49.
- Van Veen, H. W., Abee, T., Korstee, G. J. J., Pereira, H., Konings, W. N., & Zehnder, A. J. B. (1994). Generation of a proton motive force by the excretion of metal phosphate in the poly-P accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. *Journal of Biological Chemistry*, 269(47), 29509-29514. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43909-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43909-9)
- Vinh, B. T., Điệp, C. N., & Toàn, H. T. (2011). Phân lập, nhận diện vi khuẩn tích lũy polyphosphate từ chất thải trại nuôi bò sữa, chất thải sữa và ứng dụng trong xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 18a, 185-193.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G., & De Wachter, R. (1993). Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF ('*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS letters*, 317(1-2), 96-100. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81499-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81499-P)