Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2024.251

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN TRONG NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN THỦY SẢN CÓ KHẢ NĂNG HẤP THU AMMONIUM

Trương Vũ Luân[1], Nguyễn Thị Khánh Lam[2], Nguyễn Đắc Khoa[3] và Nguyễn Thị Phi Oanh[4*]
[1]*Học viên cao học ngành Công nghệ Sinh học Khoá 28, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ*
[2]*Sinh viên ngành Sinh học Khóa 45, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ*
[3]*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ*
[4]*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): 01/08/2023
Sửa bài (Revised): 19/09/2023
Duyệt đăng (Accepted): 11/10/2023

Title: *Isolation of ammonium absorbing bacteria in seafood processing wastewater*

Author(s): *Truong Vu Luan, Nguyen Thi Khanh Lam, Nguyen Dac Khoa and Nguyen Thi Phi Oanh**

Affiliation(s): *Can Tho University*

TÓM TẮT

Nước thải chế biến thủy sản có chứa protein nên khi bị phân hủy tạo amine, ammonia có mùi hôi gây ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Trong nước, ammonia được chuyển thành ammonium và được vi khuẩn hấp thu cho sự tăng trưởng. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập vi khuẩn bản địa trong nước thải chế biến thủy sản có khả năng hấp thu ammonium. Từ 4 mẫu nước thải, 24 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium đã được phân lập. Kết quả khảo sát chứng tỏ dòng WY3.3 có khả năng hấp thu ammonium (200 ppm) hiệu quả nhất, đạt 94,6% ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Nuôi cấy thông khí và môi trường có pH = 7 là điều kiện tối ưu cho sự hấp thu ammonium của dòng vi khuẩn WY3.3, đạt hiệu suất lần lượt là 91,9 % và 91,7%. Khi môi trường có bổ sung NaCl 1% và 2%, dòng WY3.3 hấp thu ammonium cao, đạt lần lượt là 99,1% và 97%. Phân tích trình tự gen 16S-rRNA cho thấy dòng WY3.3 tương đồng 99,44% với loài Bacillus funiculus nên được định danh là Bacillus sp. WY3.3.

Từ khoá: *Ammonium, Bacillus sp. WY3.3, hấp thu, nước thải chế biến thủy sản*

ABSTRACT

Seafood processing wastewater contains many organic compounds. The decomposing of these substances forms amines and ammonia resulting in odors that affect public health. In aquatic environments, ammonia is converted into ammonium which is used by bacteria for growth. This research aimed at the isolation of indigenous bacterial strains from seafood processing wastewater capable of absorbing ammonium. From 4 water samples taken from a seafood processing wastewater treatment system, 24 bacterial strains able to uptake ammonium were isolated. Our data showed that strain WY3.3 was the potential candidate for ammonium (200 ppm) absorption with an efficiency of 94.6% at 24 hours of incubation. Aeration and neutral pH (pH=7) were optimal conditions for ammonium uptake with efficiencies of 91.9% and 91.7%, respectively. The culture medium was supplemented with NaCl at 1% and 2%, strain WY3.3 was still able to absorb 99.1% and 97% ammonium. Based on 16S-rRNA gene sequence analysis, strain WY3.3 showed 99.44% sequence similarity with Bacillus funiculus and was identified as Bacillus sp. WY3.3.

Keywords: *Absorption, ammonium, Bacillus sp. WY3.3, seafood processing wastewater*

1. GIỚI THIỆU

Nước thải chế biến thủy sản có chứa nhiều protein, khi protein bị thủy phân sinh ra ammonia làm cho nước thải có lượng ammonia cao (Funge-Smith & Briggs, 1998). Ở dạng khí, nồng độ ammonia cao gây kích thích niêm mạc mũi, đường hô hấp dẫn đến dị ứng và tăng tiết dịch, co thắt khí quản và ho. Khi vào đường hô hấp, ammonia di chuyển từ phổi vào máu. Trong máu, ammonia bị oxy hóa tạo thành nitrite gây ức chế chức năng vận chuyển oxy của hồng cầu làm cho người bị xanh xao, nặng hơn có thể gây thiếu oxy não dẫn đến đau đầu, mệt mỏi, hôn mê thậm chí có thể tử vong (Thanh, 2003).

Trong môi trường nước, ammonia được chuyển hóa thành ammonium. Nồng độ ammonium trong nước cao nếu không được xử lý sẽ được chuyển hóa thành nitrite gây độc cho động vật thủy sinh (Miller & Smith, 2009). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium cho sự tăng trưởng (Kirchman et al., 1990; Hoch et al.,1992; Kirchman & Wheeler, 1998; Phú và ctv., 2021). Hiện nay, việc xử lý nước thải nói chung hoặc xử lý ammonium trong nước thải bằng phương pháp sinh học đã và đang được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng vì tiết kiệm được chi phí, đồng thời, không gây ô nhiễm môi trường (Oanh & Triệu, 2017; Phú và ctv., 2021; Oanh và ctv., 2022; Uyên và ctv., 2023). Hiện tại, ở đồng bằng sông Cửu Long chỉ có nghiên cứu của Điệp và Nam (2012) sử dụng vi khuẩn Pseudomonas stutzeri và Acinetobacter lwoffii để loại bỏ ammonium trong nước thải từ rác hữu cơ.

Từ những thực trạng trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng hấp thu ammonium hiệu quả, đồng thời, khảo sát các điều kiện tối ưu cho sự hấp thu làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng để xử lý ammonium trong nước thải.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium

Các mẫu nước thải chế biến thuỷ sản được thu tại hệ thống xử lý nước thải của công ty chế biến thủy sản Út Xi, huyện Trần Đề, tỉnh Sóc Trăng. Các mẫu nước được thu ở 4 vị trí bao gồm nước đầu vào, nước bể hiếu khí, nước bể yếm khí và nước đầu ra. Tại mỗi vị trí, mẫu nước được thu dọc theo bể ở 3 điểm (0,5 L/điểm), mỗi điểm cách nhau 1 m. Cả 3 mẫu nước được trộn đều trong trong chai nhựa sạch và thu 0,5 L mẫu đại diện tại mỗi vị trí. Sau đó, mẫu được bảo quản trong thùng nước đá khi chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập vi khuẩn.

Các bước nuôi cấy và phân lập vi khuẩn được tiến hành như sau: Cho 5 mL mẫu nước thải chế biến thủy sản vào bình tam giác chứa 45 mL môi trường khoáng tối thiểu (MM) có bổ sung 100 ppm ammonium dưới dạng NH_4Cl. Mẫu được lắc 200 vòng/phút trên máy lắc trong 1 tuần ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau 7 ngày, mẫu được để lắng 30 phút, sau đó hút 5 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn và chuyển sang bình tam giác mới có chứa 45 mL môi trường tương tự, tiếp tục nuôi cấy trên máy lắc trong 1 tuần ở điều kiện như trên (giai đoạn này được lặp lại 2 lần). Sau 3 lần nuôi cấy và chọn lọc, mẫu được để yên 30 phút. Phần dung dịch huyền phù vi khuẩn được sử dụng để phân lập vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium (Perry et al., 2002). Thành phần của môi trường MM gồm 1,42 g Na_2HPO_4, 1,36 g KH_2PO_4, 98,5 mg $MgSO_4.7H_2O$, 5,75 mg $CaCl_2.2H_2O$, 3,2 mg Na_2-EDTA, 2,75 mg $FeSO_4.7H_2O$, 1,7 mg $MnSO_4.H_2O$, 1,16 mg H_3BO_3, 1,15 mg $ZnSO_4.7H_2O$, 0,24 mg $CuSO_4$, 0,24 mg $CoCl_2.6H_2O$, 0,1 mg MoO_3, 1000 mL nước cất, pH = 7 ± 0,2 (Breugelmans, 2005).

Dung dịch huyền phù vi khuẩn được pha loãng với nước cất vô trùng đến 10-5. Sau đó, 100 µL dịch huyền phù vi khuẩn của từng độ pha loãng được hút và trải lên bề mặt môi trường MM đặc có bổ sung 100 ppm ammonium, vi khuẩn được ủ ở 32ºC. Sau 7 ngày, những khuẩn lạc rời rạc, khác nhau về hình thái được chọn để phân lập vi khuẩn bằng phương pháp cấy ria trên môi trường tương tự. Sau đó, các khuẩn lạc tiếp tục được cấy ria để phân lập thuần trên môi trường Tryptic soy agar (TSA, 30 g/L Tryptic soy broth (TSB), 15 g/L agar). Sau nhiều lần cấy chuyển, độ thuần của vi khuẩn phân lập được kiểm tra dựa vào hình thái khuẩn lạc và hình dạng tế bào dưới kính hiển vi. Các dòng vi khuẩn thuần được nuôi cấy 3 ngày trên môi trường TSA và ghi nhận các đặc điểm khuẩn lạc như hình dạng, màu sắc, bìa, độ nổi, bề mặt, kích thước và đặc điểm tế bào (Ảnh, 2006).

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

Chủng một khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường TSA vào 4 mL môi trường TSB và lắc mẫu 200 vòng/phút trên máy lắc tròn trong 24 giờ. Sau đó, mật độ quang của mẫu (OD600nm) được điều chỉnh về 0,7 (tương đương 108 CFU/mL). Tiếp theo, chủng 40 µL huyền phù vi khuẩn (đã được điều chỉnh mật độ quang) vào 4

mL môi trường MM có bổ sung NH4Cl để đạt các nồng độ ammonium khảo sát gồm 25, 50 và 100 ppm. Hai nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự gồm (i) có chủng vi khuẩn nhưng không bổ sung ammonium và (ii) có bổ sung ammonium nhưng không chủng vi khuẩn. Mẫu được lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Mật độ quang (OD600nm) của môi trường ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy được quan sát và ghi nhận. Vi khuẩn phát triển tạo sinh khối trong môi trường có bổ sung ammonium cao hơn so với môi trường không bổ sung hợp chất này chứng tỏ vi khuẩn có khả năng sử dụng ammonium. Đồng thời, hàm lượng ammonium còn lại trong môi trường được xác định được định lượng bằng phương pháp indophenol blue (Keeney & Nelson, 1982). Các dòng vi khuẩn hấp thu ammonium hiệu quả được tuyển chọn và tiếp tục khảo sát khả năng hấp thu ammonium ở nồng độ 200 ppm.

Ammonium được định lượng bằng phương pháp indophenol blue (phenol nitroprusside) (Keeney & Nelson, 1982) theo phương trình đường chuẩn y = 5,417x + 3,6072 (R2 = 0,9984), trong đó, y là độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 636 nm, x là hàm lượng ammonium.

Hàm lượng ammonium còn lại trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn được xác định như sau: Chuyển 1,5 mL dung dịch huyền phù của từng dòng vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ammonium vào ống eppendorf và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tế bào vi khuẩn. Dung dịch (500 µL) sau ly tâm được chuyển vào ống eppendorf mới, bổ sung 500 µL thuốc thử phenol nitroprusside (70 g phenol, 0,34 g nitroprusside được hòa tan trong 1000 mL nước) và để yên 5-10 phút. Sau đó, 500 µL thuốc thử sodium hypochloride (200 mL NaClO, 14,8 g NaOH và 49,8 g Na2HPO4.12H2O được hòa tan trong 800 mL nước cất) được bổ sung vào hỗn hợp và tiếp tục để yên trong 5-10 phút. Cuối cùng, 200 µL dung dịch sau phản ứng được chuyển vào đĩa 96 giếng và đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở bước sóng 636 nm.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của sự thông khí, pH và nồng độ NaCl đến khả năng hấp thu ammonium của vi khuẩn đã tuyển chọn

Các yếu tố môi trường như sự thông khí, độ pH và độ mặn đã được chứng minh có ảnh hưởng đến sự chuyển hóa ammonium ở vi khuẩn (Pollice et al., 2002; Groeneweg et al., 1994; Cortés-Lorenzo et al., 2014). Do đó, các dòng vi khuẩn hấp thu ammonium hiệu quả (tuyển chọn từ kết quả thí nghiệm ở mục 2.2) được tiếp tục khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hấp thu ammonium.

2.3.1. Ảnh hưởng của sự thông khí

Chủng 1 khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường TSA vào 4 mL môi trường TSB, mẫu được lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm và nuôi cấy qua đêm. Sau đó, mật độ quang của vi khuẩn (OD600nm) được điều chỉnh về 0,7 và chủng 40 µL huyền phù vi khuẩn (đã điều chỉnh mật độ quang) vào từng ống nghiệm chứa 4 mL môi trường MM có bổ sung ammonium 200 ppm. Vi khuẩn được nuôi cấy ở 2 điều kiện gồm (i) thông khí trên máy lắc tròn (200 vòng/phút), và (ii) không thông khí (để yên). Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Ammonium còn lại trong môi trường nuôi cấy được định lượng bằng phương pháp quang phổ ở thời điểm 24 giờ (Uyên và ctv., 2023).

2.3.2. Ảnh hưởng của pH

Huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị tương tự như mô tả ở mục 2.3.1. Môi trường MM có bổ sung ammonium 200 ppm được điều chỉnh pH đạt các giá trị gồm 5, 6, 7 và 8 (Đồng và ctv., 2019). Chủng 40 µL huyền phù vi khuẩn (OD600nm = 0,7) vào từng ống nghiệm chứa 4 mL môi trường MM đã bổ sung ammonium và điều chỉnh pH. Vi khuẩn được nuôi cấy trong điều kiện thông khí hoặc để yên dựa vào kết quả của thí nghiệm ở mục 2.3.1. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Ammonium còn lại trong môi trường nuôi cấy được định lượng ở thời điểm 24 giờ.

2.3.3. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl

Huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị tương tự như mô tả ở mục 2.3.1. Môi trường MM có bổ sung ammonium 200 ppm và NaCl lần lượt là 1%, 2% và 3% (Đồng và ctv., 2019). Chủng 40 µL huyền phù vi khuẩn (OD600nm = 0,7) vào từng ống nghiệm chứa 4 mL môi trường MM đã bổ sung ammonium và NaCl. Vi khuẩn được nuôi cấy trong điều kiện thông khí hoặc để yên và điều chỉnh pH môi trường phù hợp dựa vào kết quả của thí nghiệm ở mục 2.3.1 và 2.3.2. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Ammonium còn lại trong môi trường nuôi cấy được định lượng ở thời điểm 24 giờ.

2.4. Định danh khoa học vi khuẩn hấp thu ammonium

Dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium hiệu quả nhất được tuyển chọn để giải trình tự gen 16S-rRNA. ADN của vi khuẩn được ly trích dựa theo quy trình trích ADN của Sambrook et al. (1989) và giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa, Thành phố Hồ Chí Minh. Trình tự gen 16S-rRNA của dòng vi khuẩn tiềm năng được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi tổng 27F (5'-AGAGGTTTGATCC-TGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTT-GTTAACGACT-3') (Frank et al., 2008). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm 95ºC (6 phút); 40 chu kỳ nhân số lượng ADN với nhiệt độ và thời gian tương ứng là 5ºC (30 giây), 55ºC (30 giây), 72ºC (30 giây) và 72ºC (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 (Blazej et al., 2006). Trình tự gen 16S-rRNA của vi khuẩn hấp thu ammonium hiệu quả được so sánh độ tương đồng với trình tự gen tương ứng của các vi khuẩn trong ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BlastN.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Microsoft Excel 2016 được sử dụng để lưu trữ và xử lý số liệu thô, tính các trung bình và vẽ biểu đồ. Phần mềm Minitab 18 được dùng để thống kê số liệu, phân tích ANOVA một nhân tố bằng kiểm định Tukey's.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Trong bốn mẫu nước được thu ở 4 vị trí (nước đầu vào, nước bể hiếu khí, nước bể yếm khí và nước đầu ra), 24 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium đã được phân lập, trong đó, 5 dòng vi khuẩn được phân lập từ bể hiếu khí, 4 dòng vi khuẩn phân lập từ nước đầu vào, 6 dòng phân lập từ nước đầu ra và 9 dòng được phân lập từ bể yếm khí. Các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn hoặc không đều; màu trắng, vàng hoặc cam; bìa nguyên hoặc chia thùy; độ nổi lài hoặc mô; 11 dòng là vi khuẩn Gram âm và 13 dòng là vi khuẩn Gram dương. Trong các mẫu nước đã thu đều phân lập được vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Tuy nhiên, trong nước thải đầu vào và trong nước của bể yếm khí, số lượng vi khuẩn Gram dương được phân lập cao hơn. Ngược lại, trong nước của bể hiếu khí và trong nước đầu ra, số dòng vi khuẩn Gram âm được phân lập nhiều hơn. Theo Silhavy et al. (2010), vi khuẩn Gram dương có thể chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường do có vách peptidoglycan dày hơn so với vi khuẩn Gram âm. Như vậy, nước thải đầu vào và nước trong bể yếm khí có lẽ do hàm lượng các chất thải cao hơn nên vi khuẩn Gram dương hiện diện nhiều hơn. Đặc điểm của 24 dòng vi khuẩn phân lập được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của 24 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium

TT	Nguồn gốc	Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào		
			Hình dạng	Màu sắc	Bìa	Độ nổi	Đường kính (mm)	Gram	Hình	Kích thước (μm)
1	Bể hiếu khí	WH1.1	tròn	trắng	nguyên	lài	4	-	cầu	<0,5
2		WH1.2	tròn	vàng nhạt	nguyên	lài	1	-	cầu	1
3		WH1.3	không đều	trắng	chia thùy	lài	2x3	-	cầu	1
4		WH1.4	tròn	trắng	nguyên	lài	0,5	+	cầu	1
5		WH1.5	tròn	trắng	nguyên	lài	2	-	cầu	1
6	Nước đầu vào	WV1.1	tròn	trắng	nguyên	lài	0,5	+	que	2x3
7		WV1.2	tròn	trắng	nguyên	lài	4	+	cầu	1
8		WV1.3	tròn	trắng	răng cưa	lài	6	+	que	1x3
9		WV1.4	tròn	vàng cam	nguyên	lài	4	-	cầu	1
10	Nước đầu ra	WR1.1	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	2x4	-	cầu	1
11		WR1.2	không đều	cam	chia thùy	lài	1x2	-	cầu	1
12		WR1.3	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	4	-	cầu	1
13		WR1.4	tròn	trắng	nguyên	lài	2	+	cầu	<0,5
14		WR1.5	tròn	trắng	nguyên	lài	2	-	que	<0,5

TT	Nguồn gốc	Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào		
			Hình dạng	Màu sắc	Bìa	Độ nổi	Đường kính (mm)	Gram	Hình	Kích thước (μm)
15		WR1.6	tròn	trắng trong	nguyên	lài	4	-	cầu	1
16	Bể yếm khí	WY1.1	tròn	trắng	nguyên	lài	4	-	cầu	1
17		WY1.2	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	1	-	que	2
18		WY1.3	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	3	+	que	1x3
19		WY2.1	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	6	+	cầu	1
20		WY2.2	tròn	trắng	nguyên	lài	5	+	cầu	1
21		WY3.1	tròn	trắng	nguyên	mô	2	+	cầu	1
22		WY3.2	tròn	trắng trong	nguyên	lài	0,5	+	cầu	1
23		WY3.3	tròn	trắng	nguyên	lài	5	+	bầu dục	1x2
24		WY3.4	tròn	trắng	nguyên	lài	1	+	cầu	1

3.2. Khả năng tăng trưởng và hấp thu ammonium của các dòng vi khuẩn phân lập

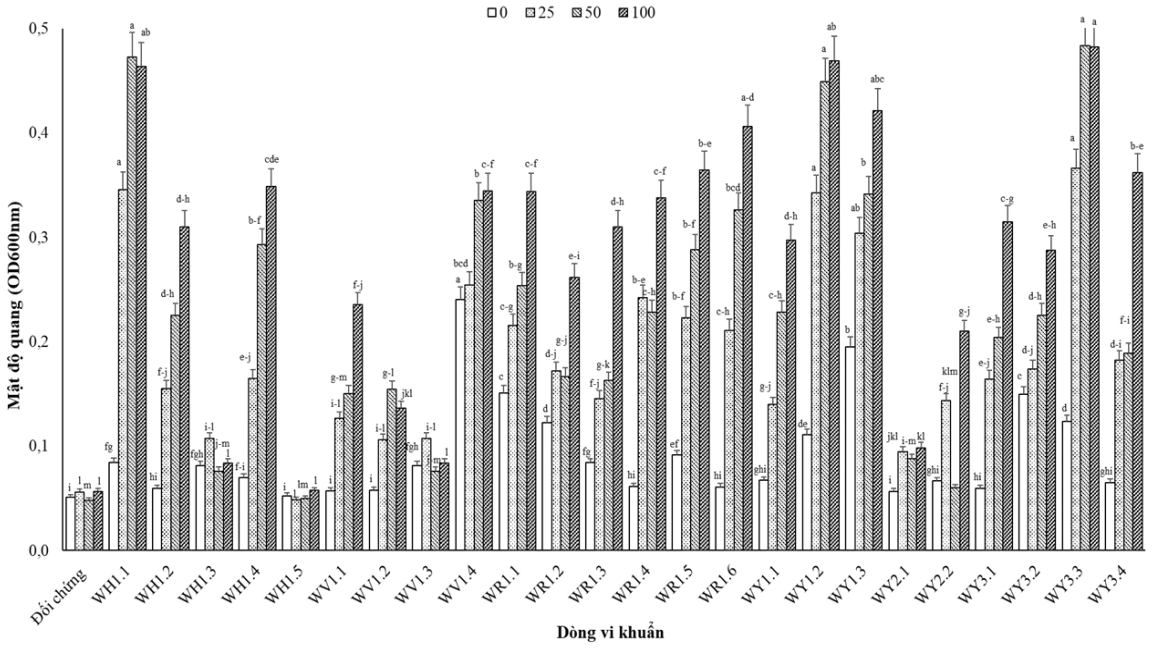
Khảo sát 24 dòng vi khuẩn cho thấy có sự khác biệt về khả năng tăng trưởng và hấp thu ammonium giữa các dòng vi khuẩn khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung 25, 50 và 100 ppm ammonium ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy.

Khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung 25 ppm ammonium, 23/24 dòng vi khuẩn tăng trưởng tạo sinh khối cao. Trong đó, 3 dòng vi khuẩn WH1.1, WY1.2 và WY3.3 tạo sinh khối cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung ammonium và so với các dòng vi khuẩn còn lại (Hình 1). Kết quả khảo sát chứng tỏ 23/24 dòng vi khuẩn hấp thu ammonium cao ở nồng độ 25 ppm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Trong đó, 6 dòng vi khuẩn WH1.1, WR1.4, WY1.2, WY3.1, WY3.3 và WY3.4 hấp thu ammonium (25 ppm) với hiệu suất trên 90% ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy (Hình 2).

Kết quả cũng cho thấy tất cả dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium ở nồng độ 50 ppm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Trong đó, 20 dòng vi khuẩn có hiệu suất hấp thu ammonium trên 70% ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy (Hình 2). Ba dòng vi khuẩn WH1.1, WY1.2 và WY3.3 có khả năng tăng trưởng cao và hấp thu hoàn toàn ammonium (Hình 1 và Hình 2)

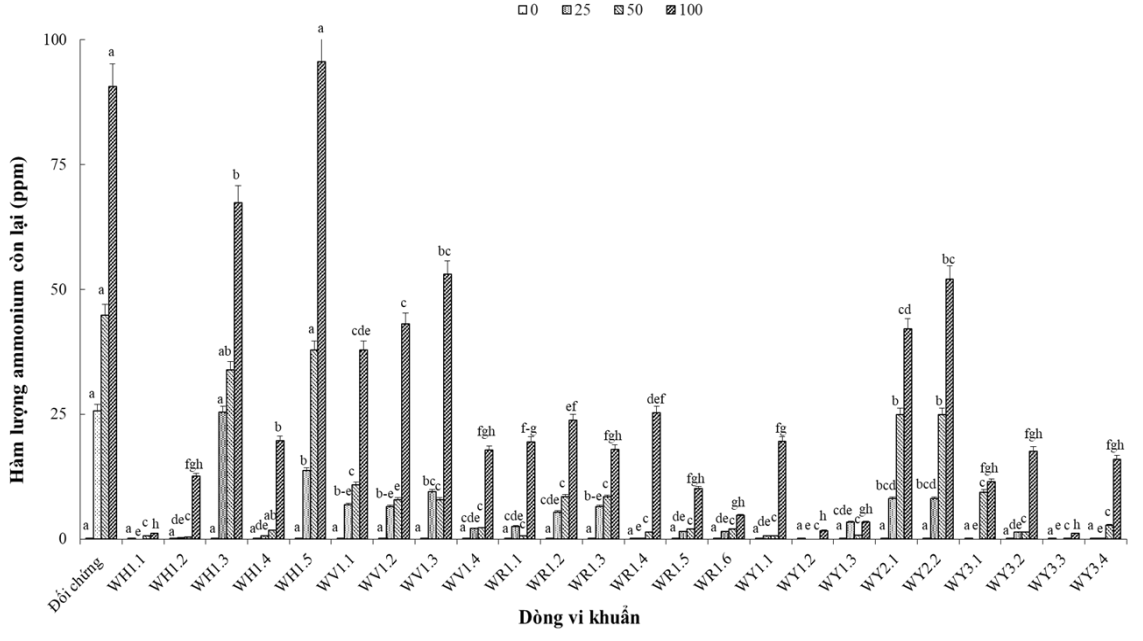
Khi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 100 ppm ammonium, các dòng tạo sinh khối cao ở nồng độ 25 và 50 ppm vẫn có khả năng tăng trưởng cao (Hình 1). Kết quả định lượng chứng tỏ 17/24 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium trên 70% ở nồng độ 100 ppm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn và so với các dòng vi khuẩn còn lại (Hình 2). Trong đó, ba dòng vi khuẩn tăng trưởng tạo sinh khối cao nhất gồm WH1.1, WY1.2 và WY3.3 cũng có khả năng hấp thu ammonium cao, đạt hiệu suất lần lượt 98,79%, 98,25% và 98,82% sau 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 (Hình 1 và Hình 2).

Dòng WY3.3 có khả năng tăng trưởng cao nhất và hấp thu ammonium (100 ppm) với hiệu suất 98,82%. Kết quả định lượng ammonium cho thấy các dòng vi khuẩn hấp thu ammonium cao bao gồm các dòng tạo sinh khối cao nhất (giá trị OD600nm đạt trong khoảng 0,42 - 0,48) và các dòng tạo sinh khối trung bình (giá trị OD600nm đạt trong khoảng 0,13 - 0,40). Các dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium thấp là những dòng có sinh khối thấp (giá trị OD600nm đạt trong khoảng 0,05 - 0,09) (Hình 1 và Hình 2).



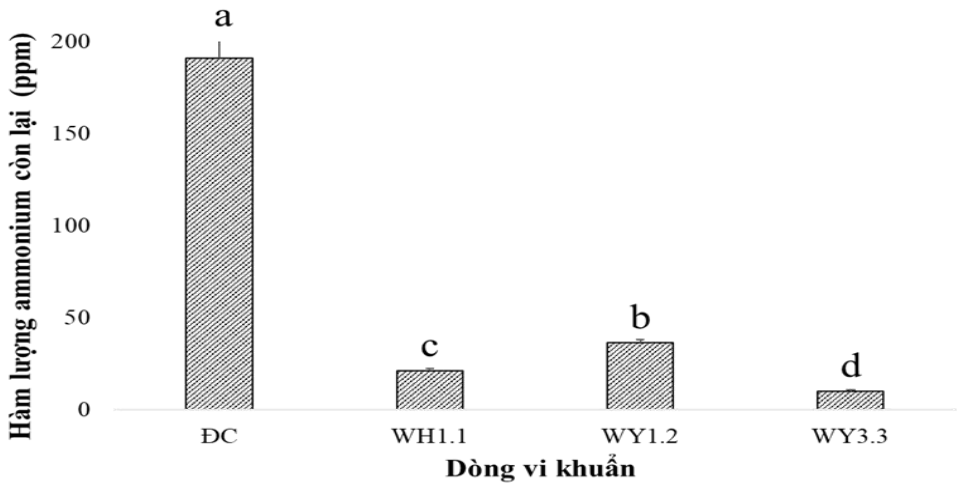
Hình 1. Khả năng tăng trưởng của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung ammonium

Ghi chú: Trong cùng một nồng độ, các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.



Hình 2. Khả năng hấp thu ammonium của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung ammonium

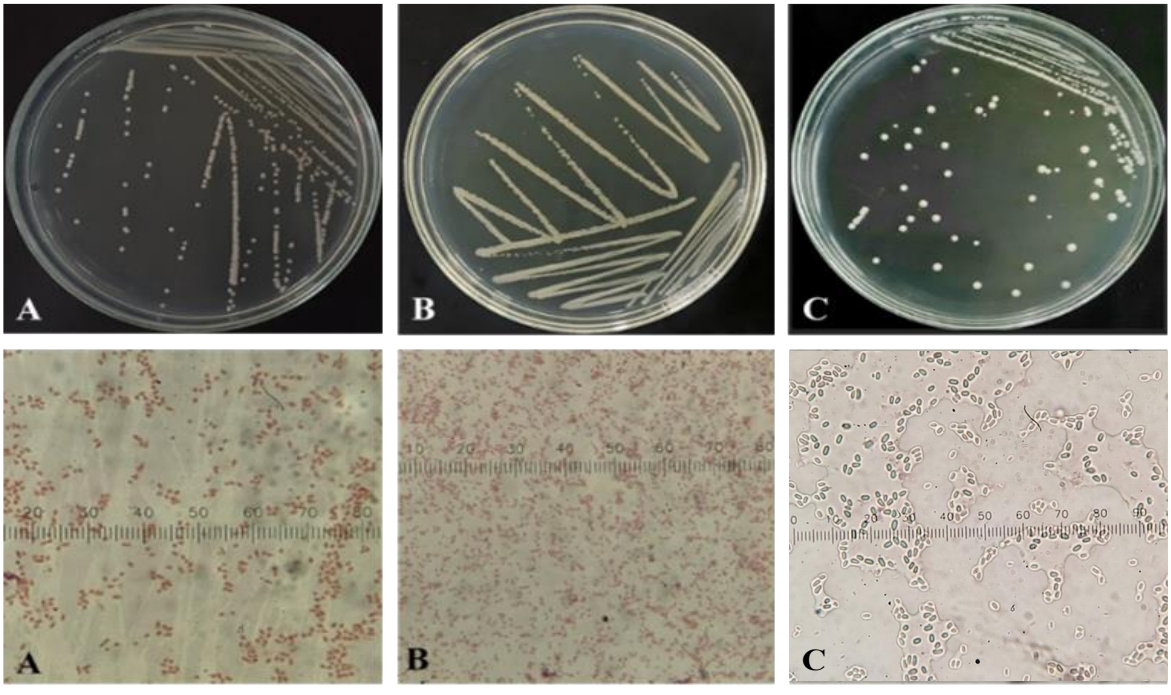
Ghi chú: Trong cùng một nồng độ, các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.



Hình 3. Khả năng hấp thu ammonium của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 200 ppm ammonium

Ghi chú: Các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Trong các dòng vi khuẩn phân lập, 3 dòng vi khuẩn WH1.1, WY1.2 và WY3.3 có khả năng hấp thu ammonium cao ở các nồng độ khảo sát. Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu cho thấy khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung 200 ppm ammonium, cả 3 dòng vi khuẩn này vẫn hấp thu ammonium hiệu quả, trong đó dòng WY3.3 hấp thu cao nhất (94,6%) ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Hai dòng vi khuẩn WH1.1 và WY1.2 có hiệu suất hấp thu ammonium lần lượt là 88,8% và 80,9% (Hình 3). Chính vì vậy, nồng độ ammonium 200 ppm được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn để khảo sát ở các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 4. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của vi khuẩn khi được nuôi cấy 3 ngày trên môi trường TSA

Ghi chú: A: dòng WH1.1, B: dòng WY1.2, C: dòng WY3.3

Zhao et al. (2010) đã chứng minh dòng vi khuẩn Acinetobacter calcoaceticus HNR được phân lập từ màng lọc sinh học (membrane bioreactor) trong phòng thí nghiệm có khả năng hấp thu hoàn toàn ammonium (120 mg/L) trong 2 ngày nuôi cấy. Theo Điệp và Nam (2012), 2 dòng vi khuẩn Pseudomonas stutzeri D3b và Acinetobacter lwoffii TN7 được phân lập từ chất thải ao nuôi thủy sản có khả năng hấp thu ammonium tương ứng 97,2%, 98,57% và 96,32%, 98,31% ở nồng độ 50 mg/L và 100 mg/L trong 3 ngày nuôi cấy. Dòng vi khuẩn Pseudomonas aeruginosa HT1 được phân lập từ nước thải sau biogas của trang trại nuôi lợn có thể hấp thu ammonium hoàn toàn (50 mg/L) sau 4 ngày nuôi cấy (Đồng và ctv., 2019).

Ba dòng vi khuẩn WH1.1, WY1.2 và WY3.3 được phân lập từ nước thải chế biến thủy sản có khả năng hấp thu ammonium ở nồng độ 200 ppm lần lượt là 88,8%, 80,9% và 94,6% sau 24 giờ nuôi cấy. Như vậy, 3 dòng vi khuẩn này có khả năng hấp thu ammonium hiệu quả ở nồng độ cao hơn nên có thể xem là những dòng vi khuẩn tiềm năng để tiếp tục nghiên cứu xử lý ammonium trong nước thải. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của 3 dòng vi khuẩn tiềm năng được minh họa ở Hình 4.

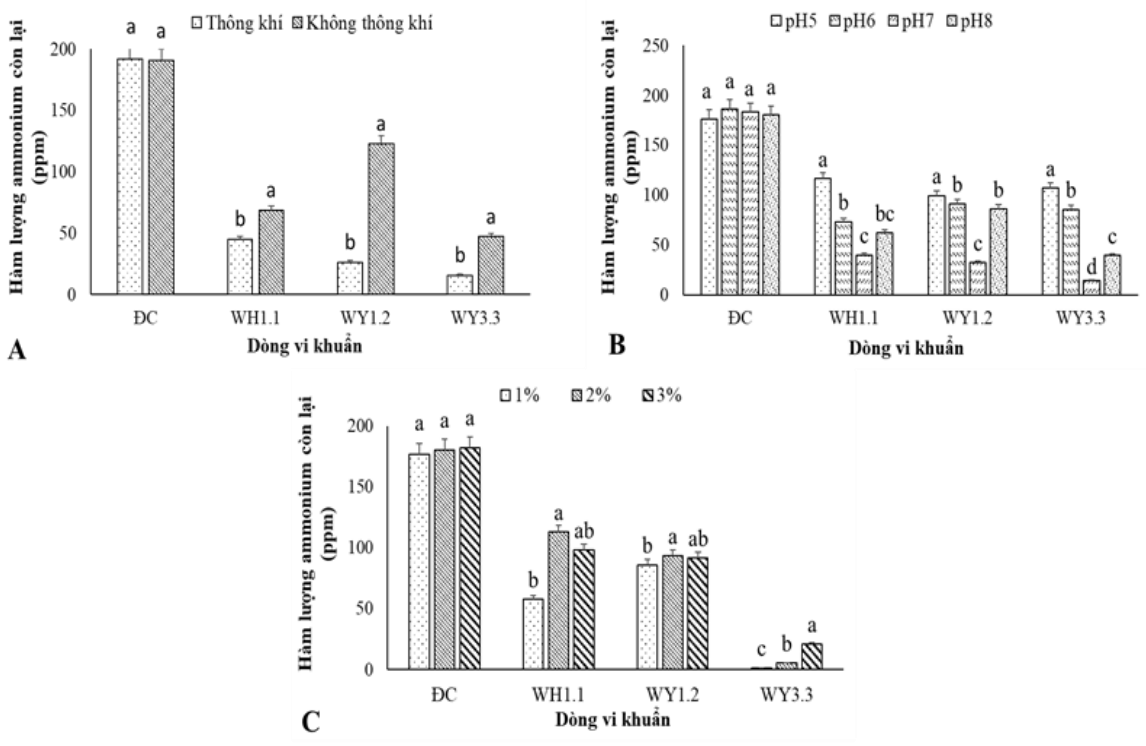
3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hấp thu ammonium của các dòng vi khuẩn tiềm năng

Sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung ammonium (200 ppm) ở điều kiện thông khí và không thông khí, 3 dòng vi khuẩn WH1.1, WY1.2 và WY3.3 hấp thu ammonium cao hơn ở điều kiện thông khí, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với khi được nuôi cấy trong điều kiện không thông khí (Hình 5A). Trong điều kiện thông khí, dòng vi khuẩn WY3.3 thể hiện khả năng hấp thu ammonium cao nhất, đạt 91,7%. Hai dòng vi khuẩn WH1.1 và WY1.2 có hiệu suất hấp thu ammonium lần lượt là 76,3% và 86,2%. Trong điều kiện không thông khí, hiệu suất hấp thu ammonium của ba dòng vi khuẩn WH1.1, WY1.2 và WY3.3 lần lượt là 63,8%, 35,5% và 75,2% chứng tỏ môi trường được thông khí thuận lợi hơn cho sự hấp thu ammonium của 3 dòng vi khuẩn khảo sát (Hình 5A).

Trong điều kiện thông khí, pH của môi trường cũng ảnh hưởng đến khả năng hấp thu ammonium của vi khuẩn. Trong môi trường có các giá trị pH khác nhau, khả năng hấp thu của mỗi dòng vi khuẩn cũng không giống nhau (Hình 5B). Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường pH=5 và pH=6 có khả năng hấp thu ammonium thấp hơn so với khi nuôi cấy trong môi trường pH=7 và pH=8. Trong đó, ở pH=7, vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium hiệu quả nhất. Dòng vi khuẩn WY3.3 hấp thu ammonium cao nhất (91,9%), khác biệt có ý nghĩa so với khi nuôi cấy trong các môi trường còn lại (Hình 5B).

Khi nuôi cấy 3 dòng vi khuẩn WH1.1, WY1.2 và WY3.3 trong môi trường MM có bổ sung 200 ppm ammonium (môi trường được điều chỉnh pH = 7) ở điều kiện thông khí và NaCl được bổ sung 1%, 2% và 3% cho thấy nồng độ NaCl khác nhau thì khả năng hấp thu ammonium ở các dòng vi khuẩn cũng khác nhau. Trong 3 dòng vi khuẩn khảo sát, dòng WY3.3 có khả năng hấp thu ammonium hiệu quả nhất, tuy nhiên, khi nồng độ NaCl tăng thì khả năng hấp thu ammonium giảm. Hiệu suất hấp thu ammonium của dòng vi khuẩn WY3.3 đạt lần lượt là 99,1%, 97% và 88,4% khi môi trường có bổ sung 1%, 2% và 3% NaCl (Hình 5C). Đối với dòng WY1.2, nồng độ NaCl khảo sát không ảnh hưởng đến khả năng hấp thu ammonium, đạt hiệu suất lần lượt là 51,3%, 48,1%, và 49,7%. Ở dòng vi khuẩn WH1.1, khi môi trường được bổ sung 1% NaCl, vi khuẩn hấp thu ammonium hiệu quả hơn (67,3%) so với 2 nồng độ NaCl còn lại.

Đồng và ctv. (2019) đã phân lập được dòng vi khuẩn Pseudomonas aeruginosa HT1 có khả năng chuyển hóa ammonium tối ưu ở nồng độ 50 ppm trong môi trường có pH = 7,5 và độ mặn từ 1% đến 3%. Theo nghiên cứu của Trung và ctv. (2022), 2 dòng vi khuẩn MT50 và MT51 được phân lập từ cỏ mần trầu (Eleusine indica) cũng có khả năng hấp thu ammonium đạt 80,36% và 82,24% trong môi trường pH = 7 và nồng độ muối là 4%. Trong nghiên cứu này, 3 dòng vi khuẩn phân lập đều có khả năng hấp thu ammonium khi môi trường pH = 7 và được bổ sung 1%, 2% và 3% NaCl, tuy nhiên, khả năng hấp thu của 2 dòng vi khuẩn WH1.1 và WY3.3 giảm khi nồng độ NaCl tăng. Ngược lại, dòng vi khuẩn WY1.2 có khả năng hấp thu ammonium không khác biệt có ý nghĩa ở 3 nồng độ NaCl khảo sát. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy dòng vi khuẩn WY3.3 hấp thu ammonium hiệu quả nhất khi môi trường được bổ sung các nồng độ NaCl là 1%, 2% và 3% với hiệu suất đạt lần lượt 99,1%, 97% và 88,4%.

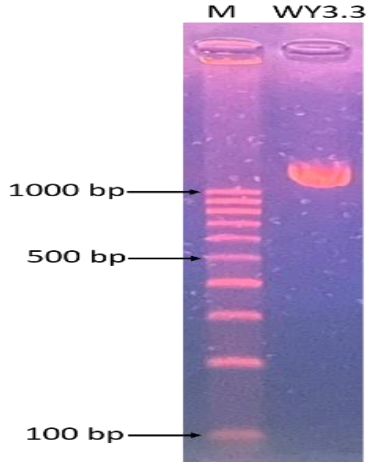


Hình 5. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hấp thu ammonium của 3 dòng vi khuẩn

Ghi chú: A: ảnh hưởng của sự thông khí, B: ảnh hưởng của pH, C: ảnh hưởng của nồng độ NaCl. Trong cùng một biểu đồ, đối với từng dòng vi khuẩn, các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

3.4. Định danh khoa học vi khuẩn hấp thu ammonium

Dòng vi khuẩn WY3.3 có khả năng hấp thu ammonium hiệu quả nhất trong các dòng vi khuẩn khảo sát nên được chọn để định danh khoa học. Sản phẩm PCR của gen 16S-rRNA được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1,5% cho thấy đoạn gen được sao chép có kích thước gần 1500 bp (Hình 6) và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger (Blazej et al., 2006). Trình tự đoạn gen 16S-rRNA của dòng vi khuẩn WY3.3 (1421 nucleotides) được so sánh với các dòng vi khuẩn trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BlastN. Kết quả phân tích và so sánh trình tự gen 16S-rRNA cho thấy dòng WY3.3 có trình tự gen tương đồng 99,44% với loài Bacillus funiculus (accession number AB271132.1) nên dòng WY3.3 được định danh là Bacillus sp. WY3.3.



Hình 6. Phổ điện di sản phẩm gen 16S-rRNA của dòng vi khuẩn WY3.3

Ghi chú: M: thang DNA chuẩn.

Theo nghiên cứu của Detsch and Stulke (2003), *Bacillus subtilis* cũng có thể sử dụng ammonium để tổng hợp glutamine như là nguồn nitơ thiết yếu của vi khuẩn. Theo nghiên cứu của Trung và ctv. (2022), 2 dòng vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp. MT50 và *Bacillus* sp. MT51 được phân lập từ cỏ mần trầu (*Eleusine indica*) cũng có khả năng hấp thu ammonium hiệu quả, đạt 80,36% và 82,24% ở môi trường có pH = 7 và nồng độ NaCl 4%. Như vậy, kết quả nghiên cứu này góp phần khẳng định vai trò của vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* về khả năng hấp thu ammonium. *Bacillus* là vi khuẩn Gram dương, có khả năng sinh bào tử nên đây là đặc điểm thuận lợi để tiếp tục nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh xử lý ammonium trong nước thải nói chung cũng như nước thải chế biến thủy sản từ nguồn vi khuẩn bản địa này.

4. KẾT LUẬN

Trong 24 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu ammonium được phân lập, 3 dòng vi khuẩn WH1.1, WY1.2 và WY3.3 có khả năng tạo sinh khối cao và hấp thu ammonium hiệu quả ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Dòng vi khuẩn tiềm năng WY3.3 có khả năng hấp thu ammonium (200 ppm) cao nhất, đạt hiệu suất 94,6%. Khi được thông khí và nuôi cấy trong môi trường có pH = 7 là điều kiện tối ưu cho sự hấp thu ammonium của dòng vi khuẩn này, đạt hiệu suất lần lượt 91,9 % và 91,7%. Ngoài ra, khi môi trường nuôi cấy được bổ sung NaCl với nồng độ từ 1% và 2%, dòng vi khuẩn WY3.3 vẫn hấp thu ammonium hiệu quả, đạt hiệu suất 99,1% và 97%. Dựa vào kết quả phân tích và so sánh sự tương đồng về trình tự gen 16S-rRNA, dòng vi khuẩn WY3.3 được định danh là *Bacillus* sp. WY3.3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ảnh, K. H. (2006). *Giáo trình Vi sinh vật học (Phần 1)*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

Blazej, R. G., Kumaresan, P., & Mathies, R. A. (2006). Microfabricated bioprocessor for integrated nanoliter-scale Sanger DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(19), 7240-7245. https://doi.org/10.1073/pnas.0602476103

Breugelmans, P. (2005). *The book of protocols for general and molecular microbiology*. Division Soil and Water Management, KULeuven, Belgium.

Cortés-Lorenzo, C., Rodríguez-Díaz, M., Sipkema, D., Juárez-Jiménez, B., Rodelas, B., Smidt, H., & González-López, J. (2014). Effect of salinity on nitrification efficiency and structure of ammonia-oxidizing bacterial communities in a submerged fixed bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, *266*, 233-240. https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.12.083

Detsch, C., & Stulke, J. (2003). Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology*, *149*(11), 3289-3297. https://doi.org/10.1099/mic.0.26512-0

Điệp, C. N., & Nam, N. T. H. (2012). Ứng dụng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* và *Acinetobacter lwoffii* loại bỏ amoni trong nước thải từ rác hữu cơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22b, 1-8.

Đồng, N. H., Việt, N. T., Hằng, Đ. T. T., Hùng, P. H., Lịch, N. Q., & Duân, T. H. (2019). Khả năng nitrit hóa amoni của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 phân lập từ nước thải sau biogas của trang trại chăn nuôi lợn ở Hà Tĩnh. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 128, 119-132. https://doi.org/10.26459/hueuni-jard.v128i3C.5282

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J., (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S-rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(8), 2461-2470. https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07

Funge-Smith, S. J., & Briggs, M. R. (1998). Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. Aquaculture, *164*(1-4), 117-133. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00181-1

Groeneweg, J., Sellner, B., & Tappe, W. (1994). Ammonia oxidation in Nitrosomonas at NH3 concentrations near Km: effects of pH and temperature. *Water Research*, *28*(12), 2561-2566. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90074-4

Hoch, M. P., Fogel, M. L., & Kirchman, D. L. (1992). Isotope fractionation associated with ammonium uptake by a marine bacterium. *Limnology and oceanography*, *37*(7), 1447-1459. https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.7.1447

Keeney, D. R., & Nelson, D. W. (1982). Part 2. Nitrogen in organic forms. In *Methods of soil analysis* (pp. 643-698). Agronomy No. 9, American Society of Agronomy, Madison, WI. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c33

Kirchman, D. L., & Wheeler, P. A. (1998). Sự hấp thu amoni và nitrat của vi khuẩn dị dưỡng và thực vật phù du ở vùng cận Bắc Cực Thái Bình Dương. *Nghiên cứu Biển sâu Phần I: Tài liệu*

Nghiên cứu Hải dương học, *45*(2-3), 347-365. https://doi.org/10.1016/S0967-0637(97)00075-7

Kirchman, D. L., Keil, R. G., & Wheeler, P. A. (1990). Carbon limitation of ammonium uptake by heterotrophic bacteria in the subarctic Pacific. *Limnology and Oceanography*, *35*(6), 1258-1266. https://doi.org/10.4319/lo.1990.35.6.1258

Miller, D. N., & Smith, R. L. (2009). Microbial characterization of nitrification in a shallow, nitrogen contaminated aquifer, Cape Cod, Massachusetts and detection of a novel cluster associated with nitrifying *Betaproteobacteria*. *The Journal of Contaminant Hydrology*, 103, 182-93. https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2008.10.011

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 Đại học Cần Thơ*, 52, 99-103. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.115

Oanh, N. T. P., Tài, V.P., Mẫn, N. N., Qui, N. V., Uyên, C. T., Khoa, N. H., & Khoa, N. Đ. (2022). Tuyển chọn chất mang để tồn trữ vi khuẩn Rhodococcus sp. XL6.2 có khả năng phân hủy benzene, toluene và xylene. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, *54*, 62-70. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.164

Oanh, N. T. P., Tài, V. P., Mẫn, N. N., Trường, B. D. T., Dương, L. T. T., & Tro, Đ. T. K. (2022). Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự phân hủy benzene, toluene và xylene của vi khuẩn Rhodococcus sp. XL6.2. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, *58*(4), 55-61. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.163

Perry, J. J., Staley, J. T., & Lory, S. (2002). Chapter 5: Isolation, nutrition, and cultivation of Microorganisms. In *Microbial life* (pp 117-124). Sinauer Associates Incorporated, 1st ed. ISBN-10: 0878936750.

Pollice, A., Tandoi, V., & Lestingi, C. (2002). Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water research*, *36*(10), 2541-2546. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00468-7

Phú, P. C., Luân, T. V., Trang, P. T., Việt, L. H., & Oanh, N. T. P. (2021). Đánh giá hiệu quả xử lý nước thải sơ chế tôm bằng mô hình IFAS có bổ sung vi khuẩn nitrate hóa. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, *57*, 82-90. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.088

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press. https://doi.org/10.4236/jhepgc.2023.92031

Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(5), *a000414*. 10.1101/cshperspect.a000414

Thanh, T. T. (2003*). Độc học môi trường và sức khoẻ con người.* Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

Trung, Đ. Q., Thu, T. T. T., & Anh, L. T. (2022). Vi khuẩn *Bacillus* sp. nội sinh phân lập từ cỏ mần trầu (*Eleusine indica*) cải thiện hiệu quả khả năng loại bỏ amoni trong nước nuôi tôm. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 2022, *20*(3), 359-369.

Uyên, C. T., Qui, N. V., Tài, V. P., Liên, N. T. P., Anh, H. Đ. K., & Oanh, N. T. P. (2023). 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. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, *59*(6), 34-43. https://doi.org/10.22144/ctujos.2023.217

Zhao, B., He, Y. L., Hughes, J., & Zhang, X. F. (2010). Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated Acinetobacter calcoaceticus HNR. *Bioresource technology*, *101*(14), 5194-5200. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.043