



DOI:10.22144/ctujos.2024.312

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC ĐÒNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG CHUYỂN HÓA NITƠ VÀ TÍCH LŨY POLY-PHOSPHATE TỪ NƯỚC THẢI SẢN XUẤT BÚN

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm*, Huỳnh Yến Nhi và Trần Bích Thùy

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

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

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 13/10/2023

Sửa bài (Revised): 03/11/2023

Duyệt đăng (Accepted): 14/06/2024

Title: Isolation and selection nitrogen metabolizing and poly-phosphate accumulating bacteria from vermicelli production wastewater

Author(s): Huỳnh Ngọc Thanh Tâm*,
Huỳnh Yến Nhi and Trần Bích Thùy

Affiliation(s): Can Tho University

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ và tích lũy poly-phosphate từ nước thải sản xuất bún tại quận Bình Thủy (Thành phố Cần Thơ). Ba mươi hai dòng vi khuẩn phân lập có khuẩn lạc dạng hình tròn, màu vàng, trắng ngà hoặc trắng đục, độ nổi mô hoặc lồi, bìa nguyên, chia thùy hoặc răng cưa, kích thước dao động từ 0,5 đến 3,5 mm, tế bào vi khuẩn có dạng hình cầu hoặc que ngắn, Gram dương hoặc Gram âm, catalase dương tính. Nghiên cứu đã tuyển chọn được năm dòng vi khuẩn T10, T11, T13 và T17 có khả năng chuyển hóa amonia, nitrate (100 mM, 200 mM và 300 mM) và nitrite (10 mM, 20 mM và 30 mM). Dòng vi khuẩn T11 có khả năng tích lũy poly-phosphate cao với hàm lượng 1,79 mg/L P₂O₅. Dòng vi khuẩn này được xác định là dòng *Bacillus velezensis* với độ tương đồng 100% bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA. Dòng vi khuẩn T11 có tiềm năng cao cho việc ứng dụng nguồn vi sinh vật trong xử lý nước thải ở tương lai.

Từ khóa: Chuyển hóa nitơ, phân lập, tích lũy poly-phosphate, vi khuẩn

ABSTRACT

The study aimed to isolate and select nitrogen metabolizing and poly-phosphate accumulating bacteria from vermicelli production wastewater at Binh Thuy district (Can Tho City). The research isolated thirty-two strains bacteria from wastewater, bacterial cells whose colonies were round, yellow, ivory white or milky white, tissue or crust buoyancy, intact or lobed cover, size ranges from 0.5-3.5 mm, bacterial cells are spherical or short rods, positive or negative-Gram. In addition, those strains of bacteria are capable of producing the catalase enzyme. The study has selected four bacterial strains such as T10, T11, T13 and T17 that have been able to metabolized amonia, nitrate (100 mM, 200 mM và 300 mM concentration) and nitrite (10 mM, 20 mM và 30 mM concentration). Besides, the research can determine one bacterial strain that is T11, that has been able to accumulate poly-phosphate with the accumulated poly-phosphate content of 1.79 mg/L. The results of 16S rRNA gene sequencing and sequencing method showed that the T11 strain was *Bacillus velezensis* with 100% similarity. Bacterial strain T11 is a promising bacterium with potential for both nitrogen metabolism and poly-phosphate accumulation, creating a premise for the application of microbial sources in wastewater treatment in the future.

Keywords: Bacteria, isolation, nitrogen metabolism, poly-phosphate accumulation

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, cùng với tốc độ đô thị hóa, công nghiệp hóa nhanh chóng là sự ô nhiễm và suy thoái môi trường, đáng chú ý là môi trường nước. Nước là nguồn nguyên liệu cho sản xuất không thể thay thế và là nguồn sống rất đặc biệt. Sự ô nhiễm môi trường nước do nhiều nguyên nhân từ nước thải công nghiệp, nước thải sinh hoạt, sử dụng quá nhiều phân bón hóa học trong sản xuất nông nghiệp,... một lý do không kém phần quan trọng gây ra tình trạng ô nhiễm nguồn nước ở nước ta đó là nước thải từ các cơ sở sản xuất thực phẩm như nước thải từ các cơ sở sản xuất bún. Đại đa số các cơ sở sản xuất bún tại Thành phố Cần Thơ, cụ thể là các cơ sở tại quận Bình Thủy đều là các cơ sở nhỏ lẻ, mang tính tự phát nên chưa thật sự chú trọng đến việc xử lý nước thải sản xuất trước khi xả thải ra môi trường.

Quá trình sản xuất bún cần một lượng nước đầu vào rất lớn kéo theo lượng nước thải thải ra cũng rất lớn thông qua các công đoạn như vo gạo, ngâm gạo,... Tuy nhiên, các cơ sở kinh doanh nhỏ lẻ hiện nay chưa chú trọng đến khâu xử lý nước thải trước khi xả ra môi trường. Nước thải sản xuất bún rất giàu chất hữu cơ, bên cạnh đó còn có các chất vô cơ gây ô nhiễm, đặc biệt là một lượng lớn các hợp chất nitơ vô cơ hòa tan dưới dạng NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- . Thành phần phosphate dạng PO_4^{3-} hoặc P_2O_5 cũng chiếm một tỷ lệ lớn góp phần gây ô nhiễm môi trường. Việc giải phóng quá nhiều các hợp chất chứa nitơ vào nước dẫn đến mất cân bằng trong chu trình nitơ đồng thời gây nên hiện tượng phú dưỡng, gây hậu quả nghiêm trọng đến hệ sinh thái (Boechat et al., 2019).

Nhiều biện pháp xử lý nước thải đã được áp dụng như: phương pháp xử lý cơ học, hóa học, hóa lý; phương pháp xử lý sinh học bằng vi khuẩn. Tuy nhiên, gần đây tình trạng ô nhiễm nguồn nước vẫn không ngừng tăng lên do các phương pháp xử lý trên chưa thể loại bỏ triệt để lượng lớn nitrate, phosphate và ammonium tồn đọng trong nước thải. Việc loại bỏ đồng thời nitơ và phosphate là một nhu cầu quan trọng để có thể tái sử dụng nước thải một cách an toàn. Hiện nay, các biện pháp xử lý sinh học để loại bỏ nitơ thường được chú trọng và ưu tiên bởi tính hiệu quả, an toàn, tiết kiệm chi phí và thân thiện với môi trường (Huanjun et al., 2021; Liu et al., 2020). Vi sinh vật và đặc biệt là vi khuẩn là nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng trong lĩnh vực loại bỏ các hợp chất nitơ và phosphate trong nước thải. Việc loại bỏ phosphate bằng cách sử dụng các vi sinh vật tích lũy poly-phosphate (PAO) hoạt động trong điều kiện kỵ khí hoặc hiếu khí, tạo điều kiện thuận lợi cho việc chuyển hóa hợp chất nitơ thành dạng nitơ tự do trả

lại môi trường thông qua việc sử dụng kết hợp quá trình nitrate hóa tự dưỡng hiếu khí và khử nitrate dị dưỡng kỵ khí (Taylor et al., 2009). Do đó, việc phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ và tích lũy poly-phosphate sẽ là tiền đề cho việc ứng dụng các dòng vi khuẩn này trong xử lý nước thải trong tương lai.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Hai mẫu nước thải được thu tại hai cơ sở sản xuất bún tại Phường Long Hòa và phường Long Xuyên, quận Bình Thủy (Thành phố Cần Thơ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn từ nước thải sản xuất bún

Thu mẫu: Nước thải được thu ở cuối nguồn thải của 02 cơ sở sản xuất bún tại thành phố Cần Thơ. Những mẫu nước thải sau khi thu về được giữ lạnh ở 4°C trong tủ lạnh và tiến hành phân lập ngay sau đó.

Phân lập vi khuẩn: Chuyển 10 mL mẫu nước thải cho vào 90 mL nước cất trong bình tam giác đã khử trùng, đậy bình bằng giấy bạc, sau đó dung dịch gốc sẽ được pha loãng 100 lần với nước cất khử trùng. Dùng micropipette hút 50 μL dung dịch nhỏ trên đĩa chứa sẵn môi trường NA (Shivaji et al., 2006) gồm beef extract (3 g/L), peptone (5 g/L), NaCl (5 g/L) và agar (20 g/L), tiếp theo dùng que tam giác trải đều dung dịch lên khắp bề mặt thạch. Sau 24 - 48 giờ, các khuẩn lạc có hình thái khác nhau xuất hiện được cấy chuyển nhiều lần cho đến khi nhận được khuẩn lạc thuần. Sau đó, mẫu được lưu trữ trong glycerol 50% ở điều kiện 4°C làm nguồn vi khuẩn cho những thí nghiệm tiếp theo.

Ghi nhận chỉ tiêu: Mô tả hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn, bao gồm: hình dạng, màu sắc, kích thước, độ nổi, dạng bìa của khuẩn lạc, nhuộm Gram và ghi nhận hình dạng tế bào của các dòng vi khuẩn.

2.2.2. Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ được phân lập từ nước thải sản xuất bún

Bố trí thí nghiệm: Các dòng vi khuẩn sau khi được làm thuần trên môi trường NA sẽ tiến hành cấy chuyển sang ba loại môi trường chứa nitơ như môi trường amoni (NH_4^+), nitrate (NO_3^-) và nitrite (NO_2^-) trong đó NH_4^+ và NO_3^- ở nồng độ 100 mM (tương ứng 0,0054 mg/L NH_4^+ và 0,0085 mg/L NO_3^-), NO_2^- ở nồng độ 10 mM (tương ứng 0,00069 mg/L NO_2^-) để so sánh sự phát triển của các dòng vi khuẩn trên

từng loại môi trường. Sau đó, tiếp tục kiểm tra khả năng phát triển của các dòng vi khuẩn ở các nồng độ cao hơn trong đó NH₄⁺ và NO₃⁻ được khảo sát ở các nồng độ tăng dần 200 mM, 300 mM và NO₂⁻ ở nồng độ tăng dần 20 mM, 30 mM. Thành phần môi trường tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ được trình bày ở Bảng 1.

Ghi nhận kết quả: Sau 48 giờ nuôi cấy, đánh giá cảm quan khả năng phát triển của các dòng vi khuẩn trên từng loại môi trường (Loan, 2020) như sau:

- (0): Không có khả năng phát triển (không có khả năng oxy hóa hoặc khử môi trường đó, không có khả năng chuyển hóa)
- (1): Phát triển yếu (sinh khối vi khuẩn ít, có khả năng chuyển hóa thấp)
- (2): Phát triển trung bình (sinh khối vi khuẩn trung bình, có khả năng chuyển hóa trung bình)
- (3): Phát triển mạnh (sinh khối vi khuẩn nhiều, có khả năng chuyển hóa mạnh)

Bảng 1. Thành phần môi trường tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa nitơ

Hóa chất	Đơn vị tính	Môi trường bổ sung nitrite	Môi trường bổ sung nitrate	Môi trường bổ sung amonium
NH ₄ Cl	g/L	-	-	5,4
NaNO ₃	g/L	-	8,5	-
NaNO ₂	g/L	0,69	-	-
NaCl	g/L	4	4	4
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	g/L	21,5	21,5	21,5
KH ₂ PO ₄	g/L	0,9	0,9	0,9
Glucose	g/L	1	1	3
Agar	g/L	20	20	20

(Diệp và Lược, 2014)

2.2.3. Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-phosphate được phân lập từ nước thải sản xuất bún

Các dòng vi khuẩn sau khi phân lập sẽ tiến hành nuôi cấy trên môi trường khử lân dạng thạch (Wang et al., 2008) bao gồm 20 g/L glucose; 37,5 mg/L KH₂PO₄ (tương ứng 39,14 mg/L P₂O₅); 0,02 g/L peptone; 0,01 g/L MgSO₄.7H₂O; 0,02 g/L NH₄Cl; 0,005 g/L CaCl₂ và 0,5 mL dung dịch vết kim loại để kiểm tra bước đầu về khả năng tích lũy poly-phosphate. Sau đó, các dòng vi khuẩn có khả năng phát triển sẽ được tiến hành chuyển 1 mL huyền phù mỗi dòng vi khuẩn (điều chỉnh mật số 10⁶ CFU/mL) vào 5 mL môi trường tích lũy poly-phosphate lỏng và tiến hành nuôi cấy lắc 150 vòng/phút trong 6 ngày ở nhiệt độ phòng. Xác định hàm lượng poly-phosphate đã tích lũy theo Wang et al. (2008) và Eixler et al. (2005). Đường chuẩn P₂O₅ sử dụng là y = 0,0177x - 0,0051 với R² = 0,999 (1). Trong đó, y: là giá trị OD_{880nm}; x: hàm lượng P₂O₅ (mg/L). Dung dịch P₂O₅ chuẩn sử dụng từ 0,5 mL đến 2,5 mL.

Ly trích poly-phosphate: Sau 6 ngày nuôi, tiến hành ly tâm 12.000 vòng/phút và trong 10 phút để thu sinh khối. Sinh khối được hòa tan trong 4 mL NaOH 0,2 M, ủ trong 20 giờ để trích poly-

phosphate. Sau đó hỗn hợp được lọc qua giấy lọc để loại bỏ xác tế bào và thu dịch lọc chứa poly-phosphate. Dịch lọc thu được chia làm 02 phần:

+ Phần 1: Đo để xác định lượng phosphate tự do (PP1) trong dịch bằng phương pháp Molybdate blue (so màu ở bước sóng 880 nm trên máy Beckman Coulter DU 640B).

+ Phần 2: Thủy phân bằng HCl 1 M ở 100°C trong 10 phút. Dịch thủy phân sau đó để nguội và đem đo hàm lượng phosphate (PP2) với phương pháp giống như phần 1.

Ghi nhận kết quả:

Xác định hàm lượng poly-phosphate nội bào (mg/L) = PP2 - PP1.

Xác định hàm lượng lân dạng P₂O₅ (mg/L) trong dịch ly tâm huyền phù vi khuẩn.

Dựa vào phương trình đường chuẩn P₂O₅ và giá trị OD của mẫu đo được để tính hàm lượng P₂O₅ có trong mẫu theo phương trình đường chuẩn (1). Sau khi có kết quả, tính hàm lượng PO₄³⁻ dựa theo công thức:

$$PO_4^{3-} = C * M_{PO_4} / M_{P_2O_5}$$

(C là hàm lượng lân có trong mẫu tương ứng với hàm lượng P₂O₅, M_{PO4} = 95; M_{P2O5} = 142)

2.2.4. Định danh dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ và tích lũy poly-phosphate bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA kết hợp thử nghiệm sinh hóa

Dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ và tích lũy poly-phosphate tốt nhất được tuyển chọn để tiến hành định danh đến mức độ loài bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA và đối chiếu trên dữ liệu ngân hàng gen NCBI.

Thành phần của phản ứng PCR bao gồm: DNA khuôn; enzyme Taq polymelase, đoạn môi 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') và 27F (5'AGAGTTTGTATCCTGGCTC-3'); dNTPs; MgCl₂ (Weisburg et al., 1991). Chu trình nhiệt trong một phản ứng PCR bao gồm biến tính sợi DNA ở 95°C trong vòng 5 phút, tăng nhiệt độ lên khoảng 98°C trong 1 phút để sợi DNA sợi đôi tách thành hai sợi đơn, giảm nhiệt độ xuống 55°C trong khoảng 30 giây và cuối cùng tăng nhiệt độ lên khoảng 72°C trong 5 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%, tiến hành giải trình tự đoạn gene 16S rRNA. Phân tích kết quả bằng BLAST trình tự trên hệ thống NCBI để so sánh với các trình tự tương đồng đã được công bố, tiến hành lập cây phả hệ và phân tích trình tự gene bằng phần mềm Mega 11. Sau khi xác định được tên chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử, việc đối chiếu với một số thử nghiệm sinh hóa đã thực hiện ở mục 2.2.1 được tiến hành để xác định chính xác hơn chủng vi khuẩn phân lập.

2.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được phân tích bằng Phần mềm Minitab 16 để đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các dòng vi khuẩn được phân lập từ nước thải cơ sở sản xuất bún

Khuẩn lạc của 32 dòng vi khuẩn phân lập đều có dạng hình tròn, có màu vàng, trắng ngà hoặc trắng đục, độ nổi mô hoặc lồi, bìa nguyên, chia thùy hoặc răng cưa, kích thước dao động từ 0,5 đến 3,5 mm trên môi trường NA (Bảng 2 và Hình 1).

Bảng 2. Đặc điểm hình thái và sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân lập

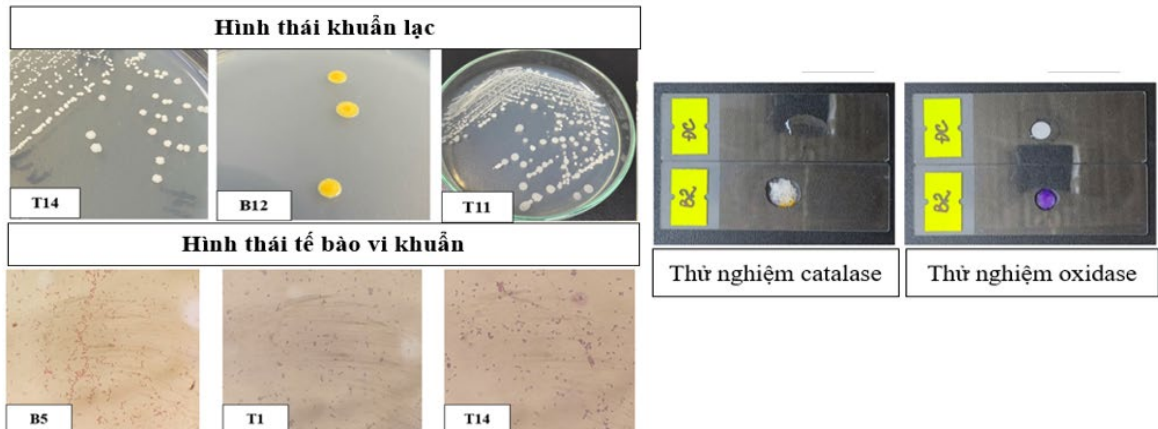
STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm hình thái					Thử nghiệm sinh hóa		
		Màu sắc	Hình dạng		Độ nổi	Bìa	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Gram	Oxidase/Catalase
			Khuẩn lạc	Tế bào					
1	T1	Trắng ngà	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	1,5-2,0	+	-/+
2	T2	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	2,0-2,5	-	+/+
3	T3	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Lài	Chia thùy	0,5-1,1	-	+/+
4	T4	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Mô	Chia thùy	0,5-1,0	-	-/+
5	T5	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	-	+/+
6	T6	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	-	+/+
7	T7	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,7-1,2	-	+/+
8	T8	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Lài	Chia thùy	1,0-1,5	+	-/+
9	T9	Vàng	Tròn	Que ngắn	Lài	Nguyên	0,5-1,0	-	+/+
10	T10	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,5-2,0	+	+/+
11	T11	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Lài	Răng cưa	3,0-3,5	+	+/+
12	T12	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Chia thùy	0,5-1,0	-	-/+
13	T13	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	1,0-1,5	-	+/+
14	T14	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Lài	Răng cưa	0,5-1,0	+	+/+
15	T15	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Lài	Chia thùy	0,5-1,0	+	+/+
16	T16	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Lài	Chia thùy	1,5-2,0	-	+/+
17	T17	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	1,5-2,0	-	+/+
18	B1	Vàng	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,0-1,5	+	+/+
19	B2	Vàng	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	1,2-1,5	-	+/+
20	B3	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	+	-/+
21	B4	Trắng ngà	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,0-1,5	+	+/+
22	B5	Trắng ngà	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	-	+/+
23	B6	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	-	+/+

STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm hình thái					Thử nghiệm sinh hóa		
		Màu sắc	Hình dạng		Độ nổi	Bìa	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Gram	Oxidase/Catalase
			Khuẩn lạc	Tế bào					
24	B7	Vàng	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,7-1,2	-	+/+
25	B8	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	1,0-1,5	-	+/+
26	B9	Trắng ngà	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	1,0-1,5	-	+/+
27	B10	Vàng	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	+	+/+
28	B11	Vàng	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	-	+/+
29	B12	Vàng	Tròn	Cầu đơn	Lài	Nguyên	0,5-1,1	-	+/+
30	B13	Trắng ngà	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	-	+/+
31	B14	Trắng đục	Tròn	Cầu đơn	Mô	Nguyên	0,5-1,0	-	+/+
32	B15	Trắng ngà	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,0-1,5	+	-/+

Ghi chú: số thứ tự mẫu từ 1 đến 17 được thu tại Long Hòa; số thứ tự mẫu từ 18 đến 32 được thu tại Long Xuyên

Kết quả kiểm tra đặc điểm hình thái tế bào vi khuẩn của 32 dòng vi khuẩn trên kính hiển vi quang học cho thấy có 21/32 dòng có dạng cầu đơn, 11/32 dòng dạng que ngắn; 11/32 dòng vi khuẩn là vi khuẩn Gram dương, 21/32 dòng là vi khuẩn Gram

âm; 6/32 dòng không có khả năng sinh enzyme oxidase, 26/32 dòng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme oxidase và tất cả các dòng vi khuẩn phân lập đều dương tính với thử nghiệm catalase.



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường NA và tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100X

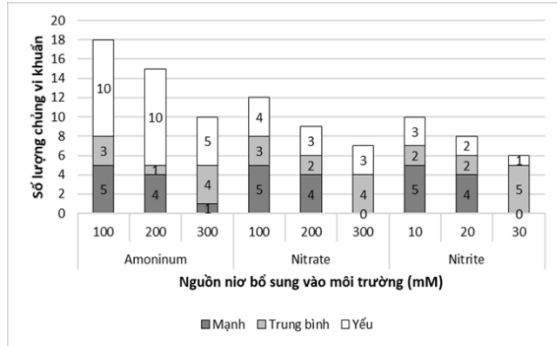
3.2. Các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ được phân lập từ cơ sở sản xuất bún

Sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường thạch có bổ sung nguồn nitơ, các dòng vi khuẩn khác nhau có khả năng chuyển hóa các nguồn nitơ khác nhau ở các nồng độ khác nhau. Cụ thể, trên môi trường bổ sung NH_4^+ với nồng độ 100 mM có 18/32 dòng vi khuẩn có khả năng oxide hóa amonium, trong đó có 5/18 dòng vi khuẩn có khả năng phát triển mạnh; 3/18 dòng vi khuẩn phát triển trung bình và 10/18 dòng vi khuẩn có khả năng phát triển yếu. Đối với môi trường bổ sung NO_3^- với nồng độ 100 mM có 12/32 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrate, trong đó có 5/12 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa mạnh; 3/12 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển

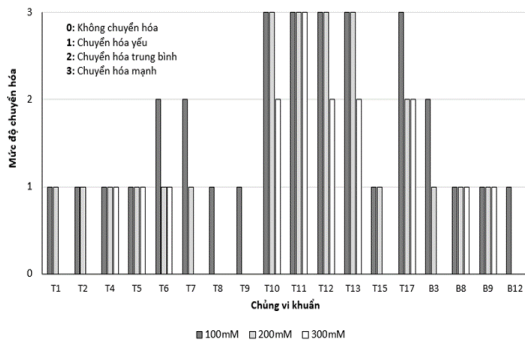
hóa trung bình và 4/12 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa yếu. Trên môi trường có bổ sung 10 mM NO_2^- có 10/32 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite, trong đó có 5/10 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa mạnh; 2/10 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa trung bình và 3/10 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa yếu. Khi tăng nồng độ NH_4^+ và NO_3^- lên 200 mM; 300 mM và NO_2^- lên 20 mM và 30 mM thì số lượng các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa giảm (Hình 2).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng vi khuẩn T10, T11, T12, T13 và T17 cho thấy khả năng chuyển hóa amonium từ mức trung bình trở lên ở cả ba nồng độ 100 mM, 200 mM và 300 mM, trong đó dòng vi khuẩn T10, T12 và T13 có khả năng chuyển hóa với mức độ mạnh ở nồng độ 100 mM và 200

mM, khi nồng độ tăng lên 300 mM thì khả năng chuyển hóa giảm xuống trung bình, riêng dòng vi khuẩn T17 cho thấy sự giảm xuống mức trung bình khi chỉ ở nồng độ 200 mM. Đặc biệt, dòng vi khuẩn T11 có khả năng chuyển hóa ở mức mạnh tại cả ba nồng độ (Hình 3).



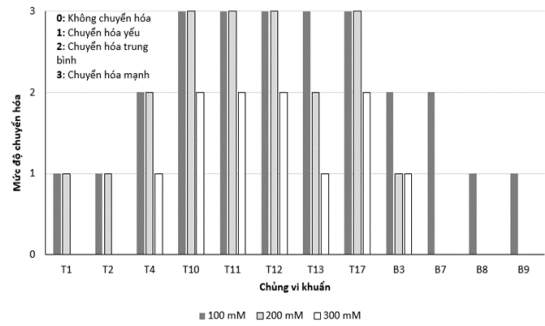
Hình 2. Khả năng chuyển hóa amonium, nitrate và nitrite ở các nồng độ khác nhau của các dòng vi khuẩn



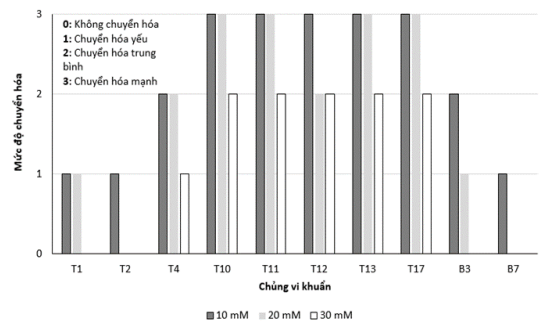
Hình 3. Khả năng chuyển hóa amonium của các dòng vi khuẩn ở nồng độ 100 mM, 200 mM và 300 mM

Tại thử nghiệm về khả năng chuyển hóa nitrate, năm dòng vi khuẩn T10, T11, T12, T13 và T17 đều có sự biến thiên về mức độ hình thành sinh khối vi khuẩn trên môi trường có bổ sung NO_3^- . Cụ thể, dòng vi khuẩn T10, T11, T12 và T17 có khả năng chuyển hóa nitrate mạnh ở hai nồng độ 100 mM và 200 mM nhưng khi tăng nồng độ lên 300 mM thì cả bốn dòng đều cho mức độ chuyển hóa giảm về trung bình. Bên cạnh đó, dòng vi khuẩn T13 lại thể hiện khả năng chuyển hóa giảm đáng kể so với 4 dòng còn lại (Hình 4).

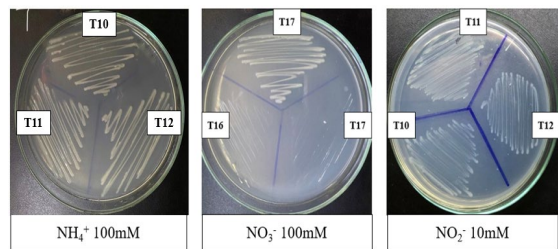
Ngoài khả năng chuyển hóa mạnh amonia và nitrate thì bốn dòng vi khuẩn T10, T11, T13 và T17 còn cho thấy tiềm năng về khả năng chuyển hóa nitrite. Bốn dòng vi khuẩn này còn cho thấy khả năng sống mạnh trên môi trường bổ sung nitrite với nồng độ 10 mM và 20 mM (Hình 5).



Hình 4. Khả năng chuyển hóa nitrate của các dòng vi khuẩn ở nồng độ 100 mM, 200 mM và 300 mM



Hình 5. Biểu đồ thể hiện khả năng chuyển hóa nitrite của các dòng vi khuẩn ở nồng độ 10 mM, 20 mM và 30 mM



Hình 6. Khả năng phát triển trên môi trường chứa nitơ của các dòng vi khuẩn

Tóm lại, qua kết quả khảo sát về khả năng chuyển hóa amonia, nitrate và nitrite cho thấy, bốn dòng vi khuẩn T10, T11, T13 và T17 là bốn dòng vi khuẩn có tiềm năng trong việc xử lý nước thải chứa nhiều nguồn nitơ độc hại. Khi nâng nồng độ các nguồn nitơ lên càng cao thì khả năng chuyển hóa vi khuẩn càng giảm vì các hợp chất này có thể gây độc cho quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu này tương tự với kết quả nghiên cứu của Loan (2020) khi tăng nồng độ amonium, nitrate và nitrite thì số lượng và khả năng phát triển sinh khối vi khuẩn bị giảm hoặc không còn khả năng phát triển. Bên cạnh đó, để xử lý được nguồn nước thải cần phải tìm được dòng vi khuẩn có khả năng

nitrate hóa và khử nitrate (Yan et al., 2022). Vi khuẩn có khả năng nitrate hóa cần phải chuyển hóa được amonia thành nitrite nhờ enzyme amoniac monooxygenase (chuyển amonia thành hydroxylamine) và hydroxylamine oxyoreductase (chuyển hóa hydroxylamine thành nitrite) (Lin et al., 2020) và cuối cùng vi khuẩn khử nitrate sẽ biến đổi nitrate thành nitơ tự do nhờ hàng loạt enzyme như nitrite reductase, nitrite oxide reductase và nitrous oxide reductase (Rajta et al., 2019). Trong nghiên cứu này, chỉ có một số ít các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa amonia, nitrate và nitrite vì có thể các dòng vi khuẩn bị hạn chế hoặc bị ức chế về các enzyme đặc trưng trong từng phản ứng hoặc các

nguồn nitơ bổ sung vào đã gây độc cho tế bào vi khuẩn, do đó chỉ có một số loài vi khuẩn đặc trưng mới có khả năng sống và phát triển sinh khối trong môi trường có bổ sung nitơ.

3.3. Các dòng vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-phosphate được phân lập từ nước thải sản xuất bún

Sau khi nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 6 ngày đã tuyển chọn được 11/32 chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-phosphate trên môi trường thạch. Sau đó 11 chủng vi khuẩn này được khảo sát khả năng tích lũy poly-phosphate trong môi trường lỏng, kết quả được trình bày tại Bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng poly-phosphate tích lũy (mg/L) bởi các dòng vi khuẩn phân lập

STT	Các dòng vi khuẩn	Hàm lượng lân trong dịch tế bào vi khuẩn (mg/L)	Hàm lượng poly-P tích lũy trong tế bào vi khuẩn (mg/L)
1	B1	8,97	0,32 ^c ± 0,07
2	B2	7,75	1,05 ^b ± 0,03
3	B11	8,84	0,36 ^c ± 0,09
4	B12	9,03	0,23 ^c ± 0,06
5	T4	9,10	0,28 ^c ± 0,00
6	T9	8,74	0,23 ^c ± 0,06
7	T10	9,27	0,06 ^c ± 0,00
8	T11	7,61	1,79 ^a ± 0,31
9	T12	9,74	0,34 ^c ± 0,00
10	T13	8,54	1,24 ^b ± 0,06
11	T17	8,78	0,23 ^c ± 0,06
Hàm lượng lân ban đầu		10,40 mg/L	

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau theo sau giá trị trung bình thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng kiểm định Turkey

Nhìn chung, các chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng tích lũy poly-phosphate với hàm lượng dao động từ 0,23 mg/L đến 1,79 mg/L, trong đó chủng vi khuẩn T11 có khả năng tích lũy poly-phosphate cao nhất với hàm lượng là 1,79 mg/L khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với các chủng vi khuẩn còn lại. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Loan (2020) về khả năng tích lũy poly-phosphate của chủng vi khuẩn Poly-P08.8.C với hàm lượng đạt 1,67 mg/L. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Deza et al. (2023) về chủng vi khuẩn *Rhodococcus jostii* 016 có khả năng tích lũy poly-phosphate từ nguồn cơ chất là KH_2PO_4 với hàm lượng poly-phosphate tích lũy là 1,17 $\mu\text{g/mL}$ (tương ứng 1,17 mg/L). Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng phosphate còn lại trong môi trường nuôi cấy dịch tế bào vi khuẩn giảm hơn so với hàm lượng lân ban đầu (10,40 mg/L). Nguyên nhân có thể là ngoài việc vi khuẩn tích lũy thành các hạt poly-phosphate chứa trong tế bào, chúng còn sử dụng phosphate để phục vụ nhu cầu

biến dưỡng của chúng như hình thành màng tế bào hay chuyển hóa năng lượng. Bên cạnh đó, vi khuẩn không chỉ có khả năng tích lũy poly-phosphate dưới dạng dự trữ nội bào mà poly-phosphate còn đóng một vai trò quan trọng trong các quá trình khác như điều hòa hoạt động của một số enzyme, kiểm soát sự biểu hiện gen (Dorofeeva et al., 2020).

3.4. Kết quả định danh chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ và tích lũy poly-phosphate từ cơ sở sản xuất bún

Kết quả trên cho thấy chủng vi khuẩn T11 có tiềm năng cao về khả năng chuyển hóa nitơ và tích lũy poly-phosphate trong nước thải. Do đó, chủng vi khuẩn T11 được chọn để giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh độ tương đồng trên ngân hàng gene NCBI. Kết quả định danh chủng vi khuẩn T11 là chủng *Bacillus velezensis* với độ tương đồng đạt 100% (Hình 7a). Từ gián đồ phá hệ, chủng vi khuẩn T11 được phân loại cùng nhóm với chủng *B. velezensis* có mã gen OR551416.1, mức độ tin cậy

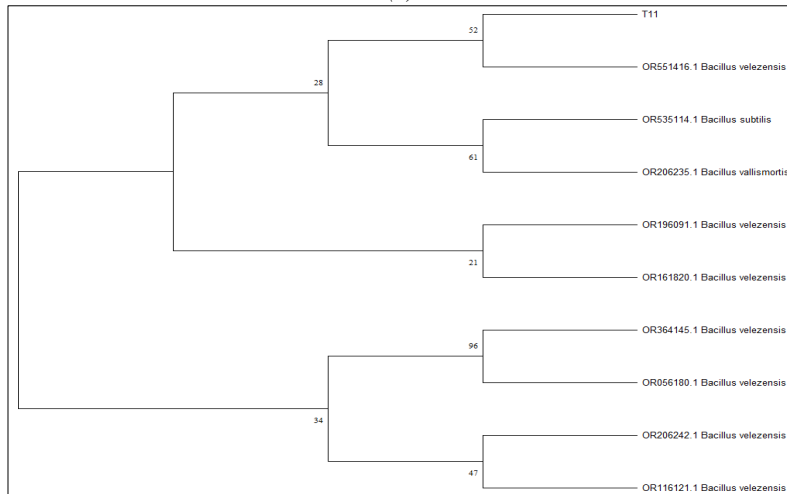
của nhánh được thể hiện qua chỉ số bootstrap 52% (Hình 7b). Kết quả so sánh trình tự đoạn gene 16S rRNA giữa chủng phân lập và các mã gen trên NCBI cho thấy số nucleotide bảo tồn là 320/970, số nucleotide biến đổi là 621/970 (Hình 7c).

Các loài vi khuẩn thuộc Chi *Bacillus* là vi khuẩn hình que và hầu hết đều không gây hại đối với con người (ngoại trừ *B. anthracis* và *B. cereus*). Các loài *Bacillus* sp. phát triển nhanh trong điều kiện giàu oxy và tồn tại bằng cách hình thành bào tử ngay cả trong điều kiện yếm khí. Hơn nữa, chúng có thể tồn tại trong thời gian dài, ngay cả khi chất dinh dưỡng cạn kiệt hoặc trong điều kiện khắc nghiệt của môi trường. Một số chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. đã

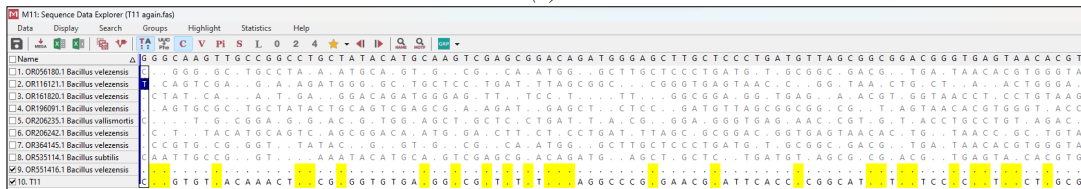
được nghiên cứu và ứng dụng trong các giai đoạn của quá trình xử lý nước thải do chúng có khả năng chuyển hóa nitơ và tích lũy poly-phosphate (Seo *et al.*, 2022). Ba chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* HT1, *Bacillus licheniformis* HT1 và *Bacillus subtilis* HT1 đã được chứng minh có khả năng chuyển hóa và loại bỏ nguồn nitơ trong nước thải nhà máy chăn nuôi đến 85% (Dong *et al.*, 2022). Nghiên cứu của Zhang *et al.* (2022) đã tuyển chọn được bốn chủng vi khuẩn *B. subtilis*, *B. albus*, *B. amyloliquefaciens* và *B. velezensis* có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường có nguồn nitơ duy nhất dạng NH_4^+ . Do đó, chủng vi khuẩn này có tiềm năng cao trong việc ứng dụng để xử lý nước thải bị ô nhiễm bởi nitơ và phospho.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain FJ25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1455	OR551416.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain AUKAR 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1456	OR535114.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: firmicutes) strain YW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1422	OR461519.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: firmicutes) strain nrh-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1444	OR392988.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: firmicutes) strain nsu-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1449	OR392892.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain SM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1454	OR364145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain ZG13-41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1464	OR243842.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain BB119 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1423	OR206257.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain BB102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1794	1794	100%	0.0	100.00%	1424	OR206242.1

(a)



(b)



(c)

Hình 7. Kết quả định danh của chủng vi khuẩn T11

(a) Kết quả BLAST trình tự chủng vi khuẩn T11 trên NCBI; (b) Cây phân loại được vẽ bằng phần mềm Mega 11 và (c) So sánh trình tự gene bằng phần mềm Mega 11

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong 32 chủng vi khuẩn phân lập, chủng vi khuẩn T11 có khả năng chuyển hóa amonium ở mức mạnh tại ba nồng độ 100 mM, 200 mM và 300 mM; có khả năng chuyển hóa mạnh nitrate ở nồng độ 100 mM và 200 mM đồng thời chuyển hóa mạnh nitrite ở nồng độ 10 mM và 20 mM. Tuy nhiên, khả năng chuyển hóa nitrate và nitrite giảm xuống mức trung bình khi tăng nồng độ lên lần lượt là 300 mM và 30 mM. Chủng vi khuẩn còn có khả năng tích lũy 1,79 mg/L poly-phosphate sau 6 ngày nuôi lactic ở nhiệt độ phòng. Kết

quả định danh cho thấy chủng T11 là chủng *Bacillus velezensis* với độ tương đồng là 100%. Kết quả phân lập và tuyển chọn trong nghiên cứu này đã góp phần đa dạng hóa nguồn vi khuẩn có tiềm năng trong việc xử lý một số hợp chất nitơ và phospho gây ô nhiễm nước thải, kết quả của nghiên cứu sẽ tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về ứng dụng các chủng vi khuẩn tiềm năng vào xử lý nước thải trong thực tiễn.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, Mã số: T2023-178.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Boechat, I. G., Magel, A. B. M., Reis, H. R. & Gucker B. (2019). Dissolved organic N in shallow tropical lakes and reservoirs: Contribution to total dissolved N and relationships with eutrophication. *International Review of Hydrobiology*, 104(5-6), 106-115. <https://doi.org/10.1002/iroh.201801958>.
- Diệp, C. N. & Lục, Đ. T. (2014). Phân lập, tuyển chọn và ứng dụng vi khuẩn chuyển hóa nitơ và phospho từ bãi rác để xử lý N và P trong nước rỉ rác. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (33), 117-124.
- Deza, M. A. C., Lobo, C. B., Ferrero M. A. & Tom, M. S. J. (2023). Poly-phosphate accumulation and cell-surface properties by autochthonous bacteria from Argentinian Patagonia. *Research in Microbiology*, 174(3), 104012. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.104012>.
- Dorofeeva, A. B., Nikolaeva, Y. U., Mardanov, A. V. & Pimenova, N. V. (2020). Role of phosphate-accumulating bacteria in biological phosphorus removal from wastewater. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(1), 1-14. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010056>.
- Dong, N. H., Viet, N. T., Hang, D. T. T., Hung, P. D. & Duan, T. H. (2022). Ammonia oxidation capacity of Bacillus bacteria in swine wastewater after biogas treatment. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 131(1D), 77-87. <https://doi.org/10.26459/hueuni.jns.v131i1D.7006>.
- Eixler, S., Selig, U. & Karsten, U. (2005). Extraction and detection methods for poly-P storage in autotrophic planktonic organisms. *Hydrobiologia*, 533(1), 135-143. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-2406-9>
- Huanjun, C., Zhou, W., Zhu, S., Liu, F., Qin, L., Xu, C. & Wang, Z. (2021). Biological nitrogen and phosphorus removal by a phosphorus-accumulating bacteria *Acinetobacter* sp. strain C-13 with the ability of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. *Bioresource Technology*, 322, 124507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124507>.
- Liu, R., Li, S., Gao, X., Yu, N., Zhao, C., Gao, C. & Lv, W. (2020). Single and combined impacts of nickel and cadmium on the performance, microbial community and enzymatic activity of sequencing batch reactors. *Science of The Total Environment*, 727, 138571. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138571>.
- Lin, Z., Huang, W., Zhou, J., He, X., Wang, J., Wang, X. & Zhou, J. (2020). The variation on nitrogen removal mechanisms and the succession of ammonia oxidizing archaea and ammonia oxidizing bacteria with temperature in biofilm reactors treating saline wastewater. *Bioresource Technology*, 314, 123760. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123760>.
- Loan, L. T. (2020). *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn kết tụ sinh học, chuyển hóa N và tích lũy poly-P trong nước thải sản xuất hồ tiêu Mỹ Tho và ứng dụng trong xử lý nước thải* (Luận án Tiến sĩ). Trường Đại học Cần Thơ.
- Rajta, A., Bhtia, R., Setia, H. & Pathania, P. (2019). Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 1261-1278. <https://doi.org/10.1111/jam.14476>.
- Seo, K. W., Gu, M. B., Tsang, Y. F., Choi, Y. S. & Chung, J. (2022). Application of endospore-forming Bacillus species to food waste-recycling wastewater treatment: A focus on the fate of macromolecular nutrients. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107584>.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright M., Narlikar J. V., Bhargava P. M. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1465–1473.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64029-0>.
- Taylor, S. M., Yiliang, H., Zhao, B. & Huang, J. (2009). Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL. *Journal of Environmental Sciences*, 21(10), 1336-1341.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62423-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62423-7).
- Wang, D.B., Li, X.M., Yang, Q., D.M., Zeng, D.X. Liao & Zhang, J. (2008). Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. *Bioresource Technology*, 99(13), 5466-5473.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.007>.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
<https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- Yan, Y., Lu, H., Zhang, J., Zhu, S., Wang, Y., Lei, Y., Zhang, R. & Song, L. (2022). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification (SND) for nitrogen removal: A review and future perspectives. *Environmental Advances*, 9, 100254.
<https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100254>.
- Zhang, F., Xi, F., Zhou, K., Zhang, Y., Zhao, Q., Song, Z. & Cui, H. (2022). Nitrogen removal performance of novel isolated *Bacillus* sp. capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(7), 3196 - 3211.
<https://doi.org/10.1007/s12010-022-03877-w>