

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

Đỗ Quang Trung^{1*}, Trần Thị Tuyết Thu², Lưu Thế Anh¹

¹*Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội*
²*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

*Tác giả liên hệ: trungcnsinh@gmail.com

Ngày nhận bài: 03.08.2021

Ngày chấp nhận đăng: 21.01.2022

TÓM TẮT

Xử lý nước thải nuôi tôm bằng phương pháp sinh học đang được các nhà khoa học quan tâm. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm sàng lọc các chủng *Bacillus* sp. chịu mặn và oxy hóa amoni để loại bỏ amoni trong nước thải nuôi tôm. Trong nghiên cứu này, đã sàng lọc được 08 chủng *Bacillus* sp. từ các vi khuẩn nội sinh phân lập từ cỏ Mần trầu. Hai chủng được lựa chọn là MT50 và MT51 có các đặc tính như: hiệu suất loại bỏ amoni cao (lần lượt là 80,36 và 82,24%), pH tối ưu là 7 và sinh trưởng tốt trong môi trường có nồng độ muối cao (4% NaCl). Ngoài ra, hai chủng này cũng cho thấy khả năng cải thiện nước thải nuôi tôm ở điều kiện phòng thí nghiệm. Thí nghiệm TN1 với 1% huyền phù tế bào chủng MT51 cho thấy lượng amoni bị loại bỏ cao nhất (62,38%), trong khi kết quả của các thí nghiệm khác không có ý nghĩa ($P > 0,05$). Thí nghiệm TN2, cả 2 chủng *Bacillus* sp. đều loại bỏ amoni từ 72,25 và 78,85% ở ngày thứ 7. Thí nghiệm TN3, chủng MT51 cho hiệu quả loại bỏ amoni cao nhất với tỉ lệ bổ sung 1% huyền phù tế bào ở ngày thứ 4 là 79,91%. Kết quả cũng cho thấy sự hình thành của nitrit và nitrat trong các thí nghiệm và các chất này được loại bỏ bởi các chủng *Bacillus* sp. nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy 02 chủng *Bacillus* sp. phân lập được có thể là loài khử nitrat hiếu khí dị dưỡng.

Từ khóa: Loại bỏ amoni, nitrat hóa- phản nitrat hóa, vi khuẩn nội sinh, *Bacillus* sp. chịu mặn.

Bacillus sp. Isolated from Goose Grass (*Eleusine indica*) Enhances the Removal Efficiency of Ammonium in Shrimp Aquaculture

ABSTRACT

Treatment of aquaculture wastewater by biological method is being more attractive to the scientists. This study aimed to screen the salt-tolerant and ammonia-oxidizing *Bacillus* endophytic bacteria having potential to reduce ammonium levels in shrimp aquaculture wastewater. In this study, eight *Bacillus* strains were screened from endophytic bacteria isolated from goose grass. Among these strains, two strains, MT50 and MT51 showed the highest efficiency for ammonium removal (80.36 and 82.24%, respectively). They optimally grew at pH of 7 and in highly salty condition (4% NaCl). Investigation in laboratory conditions for their ability in improving shrimp aquaculture wastewater showed that both *Bacillus* strains had ammonium removal from 72.25 and 78.85% at day 7th. Notably, strain MT50 in combination with unsterilized shrimp-wastewater presented the highest ammonium removal efficiency (79.91%) with 1% cell suspension at day 4th. The results also showed the nitrite and nitrate production in all experiments and these compounds were removed by the selected *Bacillus* species. Results suggested that two *Bacillus* sp. isolated might be used as heterotrophic nitrification-aerobic denitrification species.

Keywords: Ammonium removal, Endophytic bacteria, Nitrification-denitrification, Salt-tolerant *Bacillus*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Amoni là thành phần tự nhiên của chu trình nitơ trong hệ sinh thái sinh ra từ một lượng lớn thức ăn thừa (Hmadhloo & cs., 2013).

Hợp chất chứa nitơ thải ra môi trường có thể tạo ra các vấn đề nghiêm trọng, chẳng hạn như hiện tượng phú dưỡng ở các khu vực sông và ven biển (Hmadhloo & cs., 2013; Hoàng Phương Hà & cs., 2016; Nguyễn Hữu Đồng & cs., 2019; Quyen &

Vi khuẩn *Bacillus* sp. nội sinh phân lập từ cỏ Mần trâu (*Eleusine indica*) cải thiện hiệu quả khả năng loại bỏ amoni trong nước nuôi tôm

cs., 2020; Nguyen Thị Kim Anh & cs., 2021). Do đó, việc xử lý nước nuôi để giảm sự tích tụ nhanh chóng của amoni trong nuôi trồng thủy sản ngày càng trở nên quan trọng.

Quá trình sinh học sử dụng vi khuẩn nitrat hóa để biến đổi amoni thành nitrit và tiếp tục chuyển nitrit thành nitrat là một trong các phương pháp đang được quan tâm. Trước đây, vi khuẩn nitrat hóa được biết đến nhiều như *Nitrobacter* và *Nitrosomonas* (Zhang & cs., 2012; Ren & cs., 2019). Tuy nhiên, các vi khuẩn này có tốc độ tăng trưởng chậm và ít cạnh tranh hơn khi so sánh với các vi khuẩn dị dưỡng khác (Ren & cs., 2019). Một trong những vi khuẩn hứa hẹn được sử dụng để loại bỏ amoni hoặc xử lý nước thải là *Bacillus* sp. do chúng có một số ưu việt như tăng trưởng nhanh, cạnh tranh tốt, sử dụng nhiều cacbon và nitơ, chịu mặn và hình thành nội bào tử (Manzo & cs., 2013; Meeboon & Saimmai, 2019; Ren & cs., 2019). Ngoài ra, một đặc tính mong muốn để xử lý nước lợ và nuôi trồng thủy sản biển là khả năng chịu mặn. Vì vậy, việc phân lập và hiểu rõ các đặc điểm của *Bacillus* trong quá trình nitrat hóa và phản nitrat hóa là rất quan trọng để phát triển và ứng dụng chúng vào xử lý nước thải.

Vi khuẩn nội sinh là vi khuẩn sống bên trong các mô thực vật và không gây bệnh cho vật chủ (Đỗ Quang Trung & cs., 2021). Chúng đang ngày càng được quan tâm hơn so với các vi khuẩn khác vì đã phát triển nhiều loại cơ chế khác nhau để vô hiệu hóa tác động của các chất gây ô nhiễm chẳng hạn như sự biến đổi các chất ô nhiễm thành các dạng ít độc hơn và cô lập các ion kim loại trên bề mặt tế bào (Ijaz & cs., 2015). Gần đây, nhiều vi khuẩn nội sinh (VKNS) đã được phân lập từ các loài thực vật khác nhau và được sử dụng để tăng hiệu quả phân hủy các chất ô nhiễm trong nước thải (Shahid & cs., 2020; Ijaz & cs., 2015). Ijaz & cs. (2015) đã sử dụng 3 dòng vi khuẩn nội sinh (*Acinetobacter* sp., *Bacillus cereus* và *Bacillus licheniformis*) loại bỏ hơn 75% hàm lượng amoni khỏi nước thải trong 7 ngày. Do các hoạt động phân hủy chất ô nhiễm và thúc đẩy tăng trưởng thực vật, vi khuẩn nội sinh rất có triển vọng đối với một số phương pháp xử lý nước thải (Khan & cs., 2013; Shahid & cs., 2020).

Cỏ Mần trâu (*Eleusine indica*) là loại cỏ phổ biến ở Việt Nam. Chúng được coi là loài thực vật siêu tích tụ vì do có thể xử lý một số kim loại nặng (Tampubolon & cs., 2020). Ngoài ra, cỏ Mần trâu được báo cáo có thể chịu được độ mặn khá cao (55 dS/m của NaCl) (Wiecko, 2003). Các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cỏ Mần trâu đã được chứng minh có tiềm năng trong kiểm soát sinh học bệnh thực vật (Đỗ Quang Trung & cs., 2021). Do đó, mục đích của nghiên cứu này là sàng lọc các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cỏ Mần trâu có khả năng chuyển hóa amoni, trong đó tập trung phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. chịu mặn và xác định hiệu quả loại bỏ amoni trong nước thải nuôi tôm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Tổng số 16 chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cỏ Mần trâu thu thập từ tỉnh Bình Thuận, số chủng phân lập được từ thân, lá và rễ lần lượt là 5; 5 và 6 (Đỗ Quang Trung & cs., 2021). Các chủng này được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm của Viện Tài nguyên và Môi trường, 19 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội.

2.2. Hóa chất

Tất cả các hóa chất được sử dụng cho nghiên cứu này bao gồm $MgCl_2$; NaCl; K_2PO_4 ; $CaCO_3$; $FeCl_3$; Na_2COONa ; $NaHCO_3$ được cung cấp bởi công ty Merck - CHLB Đức và thạch có nhiệt độ nóng chảy thấp được mua từ hãng Biobasic, Canada. Tất cả hóa chất có độ tinh khiết từ 99,0-99,9% sử dụng cho các phép phân tích và phòng thí nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Sàng lọc vi khuẩn *Bacillus*

Các chủng vi khuẩn nội sinh thực vật được nuôi trong 10ml canh trường dinh dưỡng có bổ sung 2% NaCl và môi trường tăng sinh (peptone 5g, dịch chiết thịt bò 3g, muối biển 2g, thức ăn cho tôm 1g và H_2O 1.000ml). Canh trường được nuôi lắc ở 30°C, 170 vòng/phút trong 24 giờ. Một

mililit dịch khuẩn được pha loãng trong ống chứa 9ml nước cất. Các ống này được xử lý trong nồi cách thủy 80°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng và các chủng vi sinh không sinh bào tử (Marquis & Bender, 1985). Sau đó, lấy 0,1ml dịch pha loãng trải trên thạch dinh dưỡng được bổ sung 2% NaCl (Zhao & cs., 2017). Vì khuẩn có đặc điểm như Gram dương, hình que và hình thành nội bào tử được chọn lọc và chuyển sang môi trường mới. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. tinh khiết thu được bằng cách lặp lại nhiều lần trên đĩa thạch mới.

Chủng vi khuẩn có mức độ oxy hóa amoni cao đã được lựa chọn để giải trình tự đoạn gen 16S rRNA: tách chiết bộ gen vi khuẩn bằng bộ kit của QIAGEN, khuếch đại trình tự bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự như sau 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Phản ứng PCR được thực hiện trong 50µl master mix bao gồm: 25µl 2X Taq Master Mix (Biobasic Canada); mỗi loại mỗi nồng độ 10µM: 1,5µl; 11µl nước cất (dH₂O) và 1µl DNA từ vi khuẩn. Phản ứng PCR gồm 35 chu kỳ bao gồm 2 giai đoạn tiền biến tính: 95°C trong 5 phút; giai đoạn biến tính 95°C trong 30 giây; giai đoạn bắt cặp của các mồi: 58°C trong 1 phút; giai đoạn kéo dài đoạn khuếch đại: 72°C trong 1 phút và giai đoạn kéo dài cuối: 72°C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch TBE 1X. Sử dụng 10µl sản phẩm cho vào từng giếng. Chạy điện di với hiệu điện thế 100V trong 25 phút. Kết quả điện di được quan sát bằng máy chụp ảnh gel (Bio-Rad, Hoa Kỳ). Đoạn khuếch đại PCR của đoạn gen 16S rRNA của từng mẫu vi khuẩn được gửi giải trình tự tại hãng First Base (The Gemini, Singapore Science Park II, Singapore). Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu GenBank của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

2.3.2. Đánh giá khả năng oxy hóa amoni của các chủng *Bacillus* sp. phân lập được

Một ml chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. (mật độ tế bào khoảng 10⁷ CFU/ml) được chuyển vào môi trường dinh dưỡng NB (peptone 5g, dịch chiết

thịt bò 3g, amoni sulfat 15g và H₂O 1.000ml) và ủ ở 30°C trong 7 ngày. Hàm lượng amoni được xác định bằng kit Ammonium Test (ID 110024, Merk). Sử dụng theo hướng dẫn kèm theo của bộ kit.

2.3.3. Thử nghiệm đặc tính khử nitrat hóa dị dưỡng

Các chủng *Bacillus* sp. (mật độ tế bào khoảng 10⁷ CFU/ml) được ủ trong bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường nitrat hóa dị dưỡng ((NH₄)₂SO₄: 0,66g, natri succinat: 4,72g, KH₂PO₄: 0,50g, Na₂HPO₄: 0,50g, MgSO₄·7H₂O: 0,20g, NaCl: 20g và H₂O 1.000ml) (Zhang & cs., 2012). Quá trình ủ được thực hiện ở 30°C trên máy lắc quay ở tốc độ 160 vòng/phút trong 7 ngày. Nồng độ của nitơ amoni (NH₄⁺-N), nitrit (NO₂⁻-N) và nitrat (NO₃⁻-N) được xác định vào ngày thứ 7 (Lu & cs., 2012; Nguyễn Hữu Đồng & cs., 2019).

Hàm lượng nitrate/nitrite được xác định bằng kit NITRITE/NITRATE, colorimetric method (Merk); Hàm lượng amoni được xác định bằng kit Ammonium Test (ID 110024, Merk). Sử dụng theo hướng dẫn kèm theo của bộ kit.

2.3.4. Đánh giá nhu cầu muối và pH tối ưu cho sự phát triển của các chủng vi khuẩn thu được

Một mililit huyền phù tế bào được nuôi cấy trong một ống có 10ml môi trường dinh dưỡng NB. Độ pH của môi trường NB điều chỉnh ở các giá trị 3, 5, 7, 9 và 11. Thử nghiệm ảnh hưởng của nồng độ muối được tiến hành ở các nồng độ như sau 0, 1%, 2%, 3% và 4%. Các ống nuôi cấy được lắc với tốc độ 170 vòng/phút trong 24 giờ. Tốc độ sinh trưởng của *Bacillus* sp. được xác định bằng mật độ quang học (OD) ở 600nm (Seenivasagan & cs., 2017).

2.3.5. Chuẩn bị nước thải nuôi tôm

Bốn thí nghiệm về các loại nước thải tôm khác nhau đã được thiết kế. Để đánh giá ảnh hưởng của các vi sinh vật có sẵn trong nước thải, nước thải thí nghiệm được chia thành xử lý tiệt trùng và không tiệt trùng. Trong mỗi loại loại này, được phân chia tiếp thành lên men và

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

không lên men để đánh giá ảnh hưởng của các chất dinh dưỡng trong thức ăn đến hoạt tính của các chủng nghiên cứu. Đối với các thử nghiệm lên men, nước thải nuôi tôm được tổng hợp bằng cách lên men 1% thức ăn thương phẩm cho tôm trong 3 ngày. Tổng hợp các mẫu nước thải nuôi tôm dùng trong thí nghiệm được thể hiện trong bảng 1.

2.3.6. Đánh giá hiệu quả loại bỏ amoni

Các chủng *Bacillus* sp. có hiệu quả khử amoni cao được nghiên cứu khả năng loại bỏ nitơ vô cơ trong bốn loại nước thải của tôm đã chuẩn bị (Bảng 1). Huyền phù tế bào của các vi khuẩn *Bacillus* sp. được nuôi qua đêm trong môi trường NB lỏng (mật độ tế bào khoảng 10^7 CFU/ml). Trong mỗi nghiên cứu thử nghiệm, huyền phù tế bào vi khuẩn được sử dụng cả 1% (50ml) và 5%

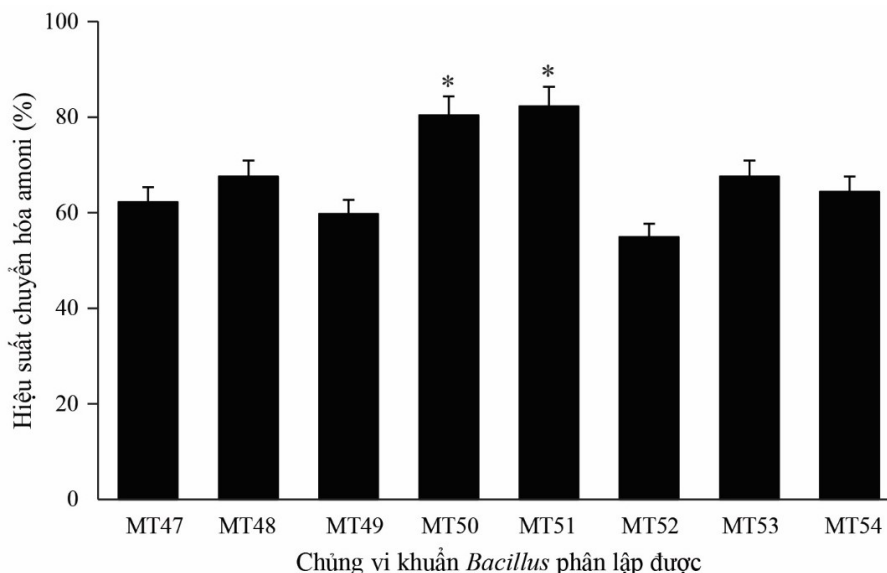
(250ml) trong 5l nước thải đã chuẩn bị. Thí nghiệm ĐC được chuẩn bị giống như các thí nghiệm khác nhưng không có thêm canh trường vi khuẩn. Tất cả các thí nghiệm và đối chứng (ĐC) được thực hiện trong 7 ngày. Mẫu nước thải được lấy mẫu và kiểm tra nồng độ amoni, nitrit và nitrat theo phương pháp đo màu tiêu chuẩn vào ngày thứ 4 và ngày thứ 7 sau khi cấy vi khuẩn (Nguyễn Hữu Đồng & cs., 2019).

2.3.7. Phân tích thống kê

Các số liệu thí nghiệm được đánh giá bằng các phương pháp thống kê phân tích biến lượng ANOVA (Analysis of Variance) một nhân tố, so sánh các giá trị trung bình theo chuẩn Duncan. Các số liệu ghi nhận được xử lý bằng Excel và phần mềm Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) phiên bản 19.

Bảng 1. Xử lý nước thải từ nuôi tôm để nghiên cứu loại bỏ amoni

Thí nghiệm	Nước thải không trộn 1% thức ăn của tôm	Nước thải trộn 1% thức ăn của tôm
TN 1	Khử trùng (121°C, 15 phút)	Lên men (trong 3 ngày)
TN 2	Khử trùng (121°C, 15 phút)	Không lên men
TN 3	Không khử trùng	Lên men (trong 3 ngày)
TN 4	Không khử trùng	Không lên men



Ghi chú: Giá trị là trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (thanh sai số) cho ba lần lặp lại. Dấu sao cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) về khả năng chuyển hóa amoni giữa các chủng (thử nghiệm Duncan).

Hình 1. Khả năng oxy hóa amoni của các chủng *Bacillus* trên môi trường nitrat hóa dị dưỡng

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Bacillus* sp.

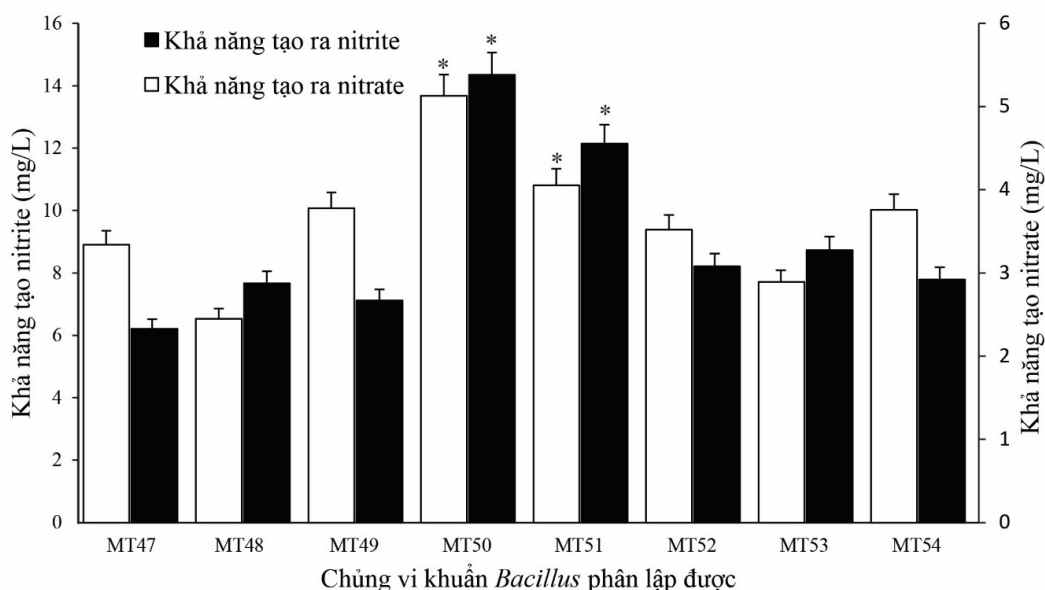
Kết quả sàng lọc cho thấy có 08 dòng vi khuẩn nội sinh (VKNS) phân lập được là vi khuẩn *Bacillus* sp. Trong đó có 05 chủng được phân lập từ rễ (MT47, MT48, MT49, MT50 và MT51); 02 chủng từ thân (MT52 và MT53) và 01 chủng từ lá (MT54).

Tất cả 8 chủng phân lập được xác định sơ bộ khả năng khử nitơ (NH_3 , NO_2^- và NO_3^-) trên môi trường nitrat hóa dị dưỡng. Kết quả cho thấy, 2 chủng phân lập là MT50 và MT51 có hiệu quả loại bỏ amoni cao hơn 80% (lần lượt là 80,36 và 82,24%) (Hình 1). Hơn nữa, hai chủng này có thể chuyển amoni thành nitrit, nhưng chỉ tiếp tục ở mức khá mạnh thành nitrat. Hình 2 cho thấy khả năng của các chủng MT50 và MT51 tạo ra

lượng nitrit lần lượt là 14,35 và 12,14 mg-N/L và lượng nitrat lần lượt là 5,13 và 4,05 mg-N/L.

Hai chủng MT50 và MT51 đã được xác định bằng phương pháp sinh học phân tử. Kết quả được trình bày trong bảng 2 cho thấy chủng MT50 có độ tương đồng là 99% với chủng *Bacillus velezensis* (mã định danh trên NCBI là MN704466.1) và chủng MT51 được xác định là *Bacillus amyloliquefaciens* (Mã định danh trên NCBI là MG822731.1) với độ tương đồng là 99%. Các trình tự vùng gen 16S rRNA của hai chủng này được lưu trữ trên ngân hàng gen với các mã số lần lượt là MZ484518 và MZ484519.

Các kết quả nghiên cứu chứng tỏ hai chủng vi khuẩn nội sinh là MT50 và MT51 là hai chủng vi khuẩn dị dưỡng. Kết quả này chứng minh không có sự sai khác về khả năng dị dưỡng giữa chủng *Bacillus* sp. nội sinh và ngoại sinh.



Ghi chú: Giá trị là trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (thanh sai số) cho ba lần lặp lại. Dấu sao cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) về khả năng tạo nitrit và nitrat giữa các chủng (thử nghiệm Duncan).

Hình 2. Khả năng tạo nitrit và nitrat của các chủng *Bacillus* trên môi trường nitrat hóa dị dưỡng

Bảng 2. Kết quả định danh chủng vi khuẩn phân lập được

Tên chủng VKNS phân lập được	Tên chủng gần nhất với chủng phân lập được	Điểm đạt cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ trùng lặp	Mã số trên NCBI
MT50	<i>Bacillus velezensis</i>	2.228	2.228	99%	MN704466.1
MT51	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2.113	2.113	99%	MG822731.1

3.2. Nhu cầu muối và pH tối ưu đối với sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus*

Kết quả cho thấy 2 chủng *Bacillus* sp. phân lập được có thể phát triển trong phổ rộng của nồng độ muối từ 0-40 g/l NaCl (Hình 3a). Tuy nhiên, khi nồng độ muối tăng dần thì mật độ của các chủng tế bào vi khuẩn cũng giảm dần (Hình 3a). Bên cạnh đó, 2 chủng *Bacillus* sp. phân lập được có sự phát triển chậm ở pH 3-5. Chúng phát triển tối ưu ở pH 7 và sau đó sự tăng trưởng giảm dần từ pH 9 đến pH 11 (Hình 3b).

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng *Bacillus* sp. phân lập được cho thấy chúng phát triển tốt trong môi trường có pH ban đầu là 7. Kết quả này phù hợp với các kết quả nghiên cứu về chủng *Bacillus* sp. đã được công bố (Zhang & cs., 2012; Sheela & cs., 2014; Ijaz & cs., 2015), trong đó ở pH trung tính 7-8 là pH tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus* sp. và trong môi trường hơi kiềm có lợi cho quá trình nitrat hóa dị dưỡng của vi khuẩn *Bacillus* sp. (Mevel & Prieur, 2000). Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy môi trường có tính axit (pH 5-6) hoặc kiềm (pH 9-10) hạn chế sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus* sp. Nhận định này phù hợp với nhận định của Sheela & cs. (2014). Sheela & cs. (2014) cho thấy sự phát triển của các loài *Bacillus* sp. phân lập bị hạn chế ở pH 6-6,5 và pH trên 8,5.

Trong nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ muối đến sự sinh trưởng của các chủng *Bacillus* sp. phân lập được cho thấy là cả hai loài này đều chịu mặn với phạm vi độ mặn rộng (0-4% NaCl). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sutin (2010), trong đó tác giả cho thấy phạm vi độ mặn đó là cần thiết cho sự phát triển tối ưu của các loài ven biển. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này có sự sai khác với kết quả nghiên cứu của Mevel & Prieur (2000). Tác giả báo cáo rằng chủng *Bacillus* sp. MS 30 có độ mặn sinh trưởng tối ưu là 16 g/l NaCl, và không thể phát triển khi độ mặn tăng lên 28,50 g/l NaCl. Sự khác nhau này có thể do sự khác nhau về chủng *Bacillus* sp. được sử dụng trong nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, hai chủng MT50 và MT51 đều được phân lập từ cây

cỏ Mần trâu thu từ vùng ven biển tỉnh Bình Thuận nên có tính kháng mặn cao và đặc tính này là khác nhau giữa các chủng phân lập được (Kearl & cs., 2019). Kết quả nghiên cứu này cho thấy tiềm năng sử dụng của hai chủng vi khuẩn *Bacillus* MT50 và MT51 trong xử lý nước thải ven biển và nuôi trồng thủy sản có chứa độ mặn cao.

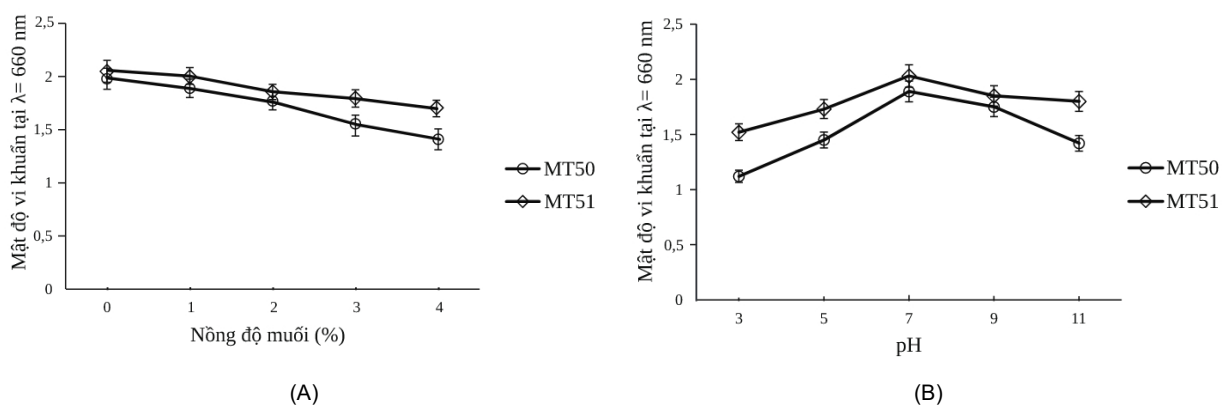
3.3. Hiệu quả loại bỏ amoni của *Bacillus* sp. trong nước thải nuôi tôm

3.3.1. Hiệu quả loại bỏ amoni

Cả hai chủng *Bacillus* MT50 và MT51 đều cho thấy khả năng loại bỏ amoni trong các thí nghiệm khác nhau của nước thải nuôi tôm (Bảng 1). Kết quả cho thấy, hiệu suất loại bỏ amoni khỏi nước thải bị ảnh hưởng bởi một số điều kiện như chủng giống vi sinh vật, thời gian nuôi, sự có mặt của các vi sinh vật bản địa và sự lên men của môi trường nuôi cấy.

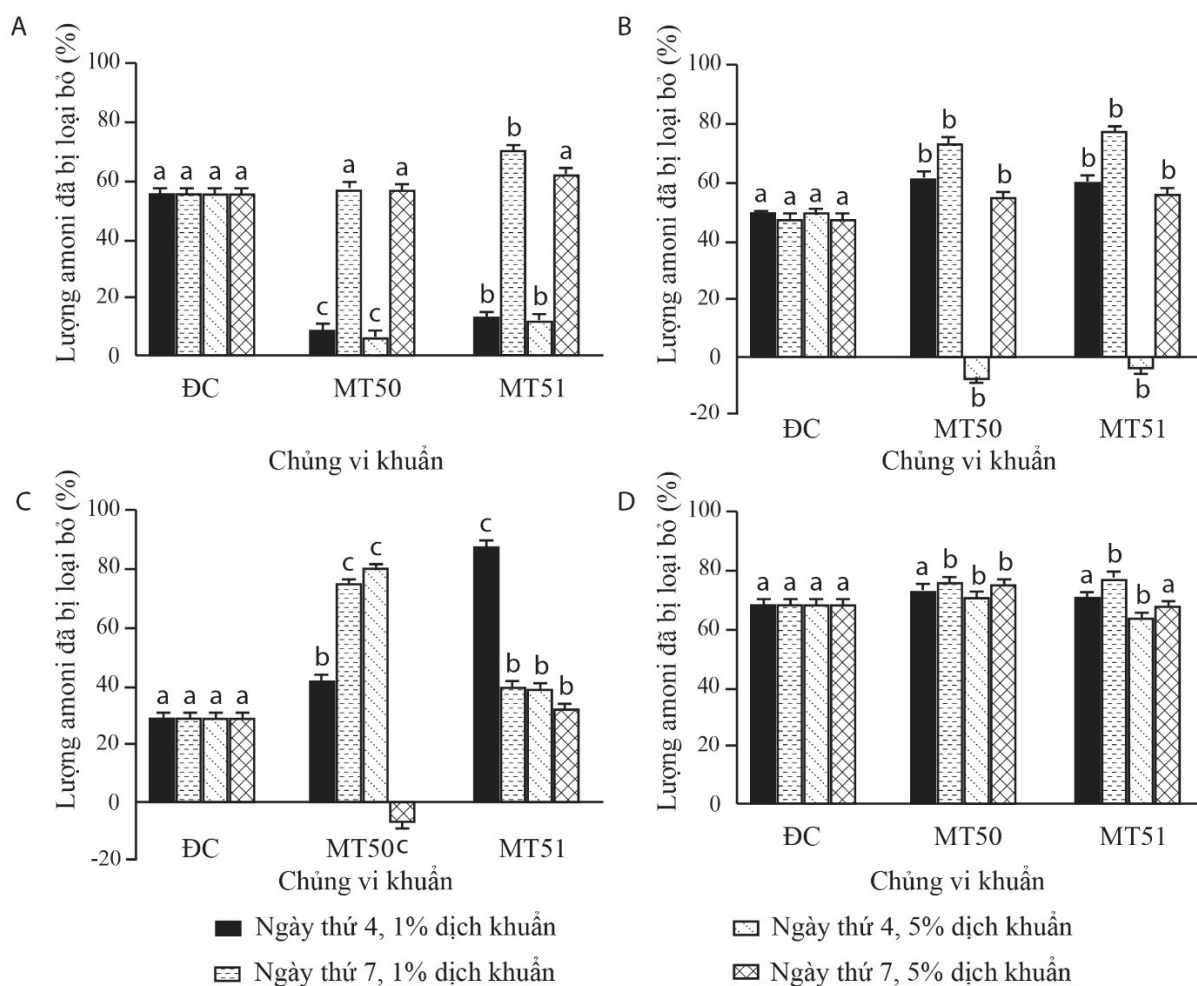
Trong kết quả của thí nghiệm 1 (TN1) cho thấy nồng độ vi khuẩn ban đầu không ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất chuyển hóa amoni. Hỗn dịch tế bào 1% và 5% của cả 2 chủng MT50 và MT51 loại bỏ amoni chậm ở ngày thứ 4 (amoniac ban đầu là $3,56 \pm 0,06$ mg-N/L) và tăng lên 55-62,38% cho đến ngày thứ 7. Trong khi đó, lượng amoni bị loại bỏ không có ý nghĩa ($P > 0,05$) ở tất cả các nghiệm thức đối chứng (Hình 4A).

Tuy nhiên, trong thí nghiệm 2 (TN2) mật độ vi khuẩn ban đầu cho thấy ảnh hưởng rõ ràng. Kết quả cho thấy với 1% huyền phù tế bào của hai chủng MT50 và MT51 đã loại bỏ amoni lần lượt với hiệu suất lần lượt là 72,25 và 78,85% (amoniac ban đầu là $2,26 \pm 0,07$ mg-N/L) ở ngày thứ 4 và 7. Tuy nhiên, ở nồng độ 5% huyền phù tế bào đã cho thấy kết quả âm ở ngày thứ 4. Điều này có thể do việc bổ sung khối lượng lớn các vi khuẩn này đã tạo ra amoniac trong quá trình điều chỉnh của tế bào vi khuẩn khi chuyển sang các điều kiện mới. Sau đó, các tế bào sẽ thích ứng với nước thải và biểu hiện khả năng loại bỏ amoni (Hình 4B). Như vậy, kết quả thí nghiệm cho thấy mật độ tế bào vi khuẩn ban đầu ảnh hưởng rõ nét đến hiệu suất oxy hóa amoni của chúng.



Ghi chú: Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SD (thanh sai số) cho ba lần lặp lại.

Hình 3. Biểu đồ sinh trưởng của các chủng vi khuẩn *Bacillus* dưới các độ mặn (A) và pH (B) khác nhau



Ghi chú: A: TN1; B: TN2; C: TN3; D: TN4.

Giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$). Giá trị với các ký tự khác nhau cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) về khả năng loại bỏ amoni giữa các chủng (thử nghiệm Duncan).

Hình 4. Hiệu quả loại bỏ amoni của các chủng *Bacillus* sp. phân lập được

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

Bên cạnh đó, trong thí nghiệm 3 (TN3) cho thấy ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn đến khả năng loại bỏ amoni. Chủng MT51 (với 1% huyền phù tế bào) thể hiện khả năng loại bỏ amoni nhanh chóng ở ngày thứ 4 (hiệu suất là 79,91%), trong khi chủng MT50 cho thấy hiệu quả với 5% huyền phù tế bào ở ngày thứ 4 là 72,89% (Hình 4C). Kết quả này có thể do các vi sinh vật bản địa trong nước thải đã có tác động tương hỗ đến hoạt động loại bỏ amoni của các chủng vi khuẩn MT50 và MT51.

Thí nghiệm 4 (TN4) cho thấy hiệu quả loại bỏ amoni tổng thể (53,29-76,42%) thấp hơn các thí nghiệm khác (lượng amoni ban đầu là $1,19 \pm 0,02$ mg-N/L). Các kết quả không cho thấy sự ảnh hưởng của mật độ tế bào ban đầu và thời gian xử lý đến hiệu suất loại bỏ amoni ($P > 0,05$) (Hình 4D).

Ngoài ra, kết quả loại bỏ amoni của thí nghiệm 3 (TN3) của tất cả các chủng *Bacillus* sp. cho hiệu quả cao hơn các thí nghiệm khác. Thí nghiệm TN3 dùng nước thải nuôi tôm thô, không được khử trùng; do đó các vi khuẩn bản địa có sẵn trong nước thải có thể tham gia vào quá trình loại bỏ amoni (Ongsara & cs., 2012). Hơn nữa, thức ăn nuôi tôm lên men giải phóng các hợp chất hữu cơ làm chất dinh dưỡng cung cấp cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Sự kết hợp giữa các chủng *Bacillus* sp. phân lập được trong nghiên cứu này và các vi sinh vật bản địa là sự hiệp đồng về khả năng loại bỏ amoni. Các kết quả này chứng tỏ khả năng loại bỏ amoni trong nước thải nuôi tôm nếu chỉ dùng các chủng *Bacillus* là kém hơn so với sự hợp tác của chúng với các vi sinh vật có sẵn trong nước thải.

Nghiên cứu này đã cho thấy hiệu suất oxy hóa amoni bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như chủng vi khuẩn, điều kiện môi trường (lên men và khử trùng) và ít bị ảnh hưởng bởi lượng dịch khuẩn ban đầu dùng cho thí nghiệm. Trong điều kiện không khử trùng và môi trường được lên men cho hiệu suất loại bỏ amoni cao nhất cho cả hai chủng MT50 và MT51.

3.3.2. Hiệu quả loại bỏ nitrit và tạo thành nitrat

Nồng độ nitrit ban đầu của nước thải nuôi tôm được duy trì ở mức thấp (<1 mg-N/L). Tuy

nhiên, lượng NO₂ trong các thí nghiệm được tạo ra và loại bỏ trong quá trình ủ nhờ sử dụng các chủng vi khuẩn phân lập được (Hình 5A và 5B). Trong điều kiện tiệt trùng và không lên men (thí nghiệm TN2) cũng như trong điều kiện không tiệt trùng và lên men (thí nghiệm TN3), cả hai chủng MT50 và MT51 đều biểu hiện khả năng loại bỏ nitrit với hiệu suất cao (80-83%) so với đối chứng. Kết quả cho thấy sự lên men hay không lên men thức ăn có ảnh hưởng không đáng kể đến khả năng loại bỏ nitrit của hai chủng MT50 và MT51. Mặt khác, kết quả của thí nghiệm đối chứng trong TN2 cho thấy khả năng tạo thành và loại bỏ nitrit rất thấp trong khi kết quả đối chứng ở TN3 cho thấy khả năng tạo thành và loại bỏ nitrit khá cao (khoảng 29%). Điều này chứng tỏ việc tiệt trùng có ảnh hưởng đến mật độ ban đầu của các vi sinh vật trong nước thải và các tế bào vi sinh vật sống trong nước thải đóng một vai trò nhất định trong việc loại bỏ nitrit trong nước thải.

Bên cạnh khả năng loại bỏ nitrit, khả năng tạo nitrat của các chủng *Bacillus* sp. cũng được quan tâm (Hình 5C và 5D). Kết quả thí nghiệm TN1 cho thấy khả năng loại bỏ nitrat cao nhất của chủng MT50 là 81,30% ở ngày thứ 7 (5% huyền phù tế bào), trong khi chủng MT51 cho thấy khả năng loại bỏ nitrat cao nhất (81,12%) ở ngày thứ 4 (5% huyền phù tế bào) (Hình 5c). Thêm vào đó, việc loại bỏ nitrat trong thí nghiệm TN3 cho thấy mật độ của chủng vi khuẩn cũng ảnh hưởng đáng kể đến khả năng loại bỏ nitrat trong môi trường (Hình 5d). Các kết quả chứng tỏ sự hình thành và loại bỏ nitrat phụ thuộc vào chủng vi sinh vật và mật độ ban đầu của chúng. Ngoài ra, kết quả thí nghiệm đối chứng (ĐC) cho thấy không có sự khác biệt nhiều giữa TN1 (Hình 5C) và TN3 (Hình 5D) chứng tỏ các vi sinh vật bản địa có sẵn trong nước thải ít ảnh hưởng đến khả năng loại bỏ nitrat của hai chủng MT50 và MT51.

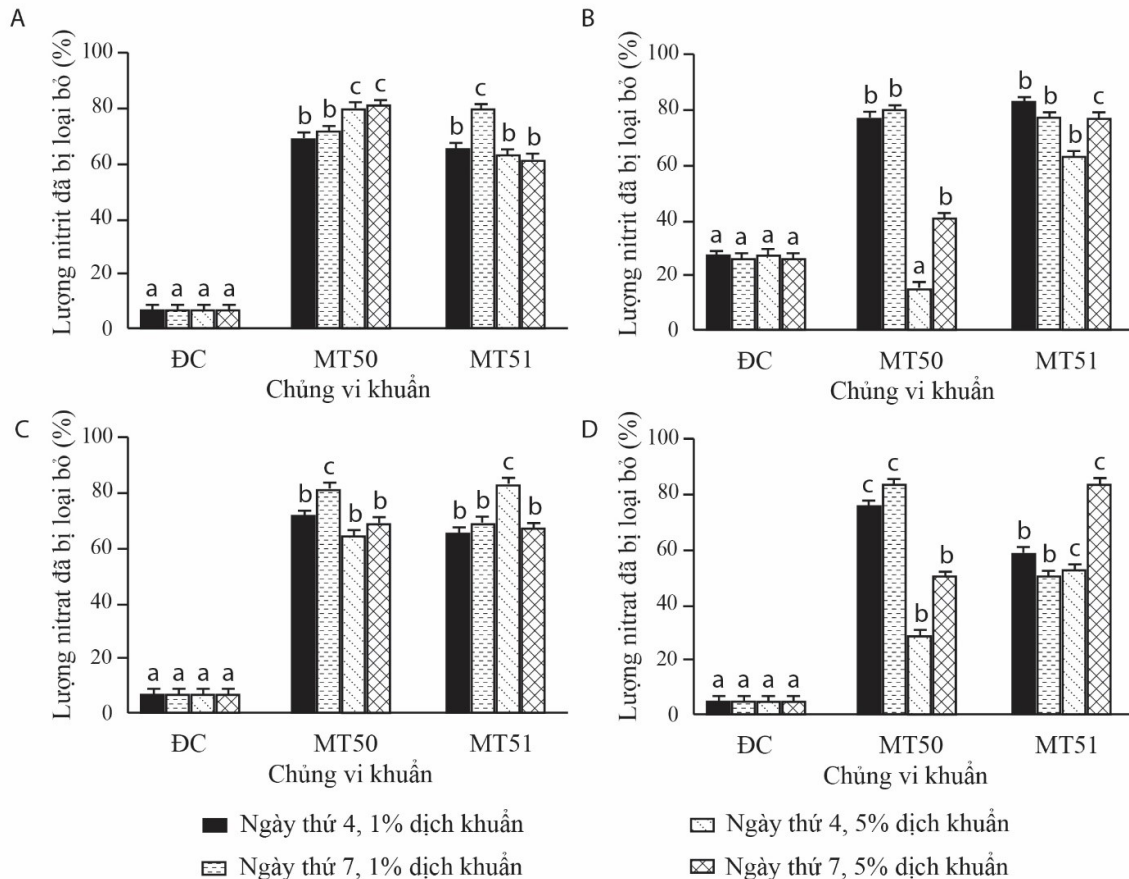
Thức ăn của tôm chủ yếu bao gồm protein và photpho (Hmadhloo & cs., 2013). Những thức ăn này sẽ giải phóng các hợp chất nitơ và photpho để phục vụ cho vi khuẩn *Bacillus* sp. và các vi sinh vật khác (McIntosh & cs., 2001; Dechmahitkul & cs., 2007). Do đó, trong nước thải nuôi tôm không được khử trùng các vi sinh

vật có sẵn trong nước thải đã tham gia phân hủy các chất hữu cơ và vô cơ (O-Thong & cs., 2003). Các chủng *Bacillus* sp. là vi khuẩn nitrat hóa dị dưỡng, loại bỏ amoni hiệu quả và quá trình nitrat hóa ít phức tạp hơn vi khuẩn tự dưỡng (Sheela & cs., 2014). Do đó, *Bacillus* sp. dị dưỡng có thể có tiềm năng ứng dụng cao trong xử lý nước thải nuôi trồng thủy sản. Trong nghiên cứu này, các phân lập *Bacillus* sp. đều dẫn đến quá trình nitrat hóa hiệu quả. Yang & cs. (2011) cho rằng NO_2^- được chuyển thành NO_3^- bằng quá trình nitrat hóa và nitrat có thể tiếp tục được chuyển thành nitơ tự do trong các phản ứng khử nitơ hiệu quả bởi vi khuẩn nitrat hóa dị dưỡng. Trong nghiên cứu này, hai chủng *Bacillus* sp. cho thấy đặc điểm loại bỏ amoni cũng như khả năng chuyển amoni thành nitrit. Hơn nữa, chúng có

thể loại bỏ và biến đổi nitrit thành nitrat cũng như loại bỏ nitrat. Tuy nhiên, cần phân tích thêm khí nitơ tự do từ nitrat trong hệ thống vận hành để củng cố kết luận này.

4. KẾT LUẬN

Hai chủng vi khuẩn nội sinh MT50 và MT51 phân lập từ cỏ Mần trầu được xác định lần lượt là chủng *Bacillus velezensis* MT50 (mã Genbank MN704466.1) và *Bacillus amyloliquefaciens* MT51 (mã Genbank MG822731.1) có khả năng loại bỏ amoni hiệu quả cao và chịu mặn đến 4% NaCl. Thêm vào đó, hai chủng MT50 và MT51 có khả năng nitrat hóa dị dưỡng nên có khả năng ứng dụng trong xử lý ao nuôi tôm.



Ghi chú: A: TN2; B: TN3; C: TN1; D: TN3.

Giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$). Giá trị với các ký tự khác nhau cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) về khả năng loại bỏ nitrit và nitrat giữa các chủng (thử nghiệm Duncan).

Hình 5. Hiệu quả loại bỏ nitrit (A-B) và nitrat (C-D) của các chủng *Bacillus* sp. phân lập được

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG.21.60 “Nghiên cứu sàng lọc vi khuẩn nội sinh thực vật có khả năng oxy hóa amoni nhằm định hướng ứng dụng trong công nghệ bãi lọc sinh học” của Đại Học Quốc Gia Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Charoendat U., Chumchareon M. & Phumee P. (2016). Effects of Creat (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) extract on growth performance and bacterial disease resistance in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). RMUTSV Research Journal. 8(2): 190-202.
- Dechmahitkul W., Youkong C., Poomputra K., Akeprathumchai S. & Mekvijitsaeng P. (2007). Study on media formulation and production process of *Bacillus subtilis* spores for animal probiotics. KMUTT Research and Development Journal. 30(2): 251-259.
- Đỗ Quang Trung, Nguyễn Thị Thu Hằng, Đinh Mai Vân, Phạm Bích Ngọc, Trần Thị Hằng, Lưu Thế Anh & Phí Quyết Tiến (2021). Khả năng đối kháng của vi khuẩn nội sinh từ cỏ Mần trâu với vi nấm gây bệnh thối ngọn cành trên thanh long (*Hylocereus undatus*). Tạp chí Khoa học: Công nghệ và Khoa học Tự nhiên. 37(2): 60-69.
- Hoàng Phương Hà, Nguyễn Quang Huy & Hoàng Thị Yến (2016). Nghiên cứu một số điều kiện thích hợp cho sinh trưởng và tạo biofilm của các chủng vi khuẩn khử nitrate. Tạp chí Công nghệ sinh học. 14(1): 191-196.
- Hmadhloo S., Tanyaros S. & Phumee P. (2013). Effect of C : N ratio in integrated culture of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) using biofloc technology. RMUTSV Research Journal. 5(1): 96-106.
- Ijaz A., Shabir G., Khan Q.M. & Afzal M. (2015). Enhanced remediation of sewage effluent by endophyte-assisted floating treatment wetlands. Ecological Engineering. 84: 58-66.
- Khan S., Afzal M., Iqbal S. & Khan Q.M. (2013). Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. Chemosphere. 90: 1317-1332.
- Kearl J., McNary C., Lowman J. S., Mei C., Aanderud Z. T., Smith S. T., West J., Colton E., Hamson M. & Nielsen B. L. (2019). Salt-Tolerant Halophyte Rhizosphere Bacteria Stimulate Growth of Alfalfa in Salty Soil. Front Microbiol. 10:1849.
- Lu Y., Wang X., Liu B., Liu Y. & Yang X. (2012). Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying strain W1. Chinese Journal of Chemical Engineering. 20(5): 995-1002.
- Manzo N, Luccia D. B., Isticato R., Apuzzo D. E., Felice D. M. & Ric E. (2013). Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *B. pumilus* SF214. PlosOne. 8(4): 1-12.
- Marquis E. R. & Bender G. R. (1985). Mineralization and heat resistance of bacterial spores. Journal of Bacteriology. 161(2): 789-791.
- McIntosh D., Samocha T. M., Jones E. R., Lawrence A. L., Horowitz S. & Horowitz A. (2001). Effects of two commercially available low-protein diets (21% and 3%) on water and sediment quality on the production *Litopenaeus vannamei* in an outdoor tank system with limited water discharge. Aquaculture Engineering. 25(2): 69-82.
- Meeboon N. & Saimmai A. (2019). Characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* AS6 isolated from mangrove sediment in Phuket province. Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal. 11(1): 67- 83.
- Mevel G. & Prieur D. (2000). Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. Canadian Journal of Microbiology. 46(5): 465-473.
- Nguyễn Hữu Đồng, Nguyễn Thị Việt, Đinh Thị Thu Hằng, Phan Đỗ Hùng, Nguyễn Quang Lịch & Trần Hòa Duân (2019). Khả năng nitrat 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: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. 128(3C): 119-132.
- Nguyen Thi Kim Anh, Nguyen Thi Tram Anh, Chuong T.P.N Bui, Curtis Jolly, Nguelifack & Brice Merlin. (2021). Shrimp farmers risk management and demand for insurance in Ben Tre and Tra Vinh Provinces in Vietnam. Aquaculture Reports. 19: 100606.
- Ongsara N., Sungpud J. & Liamtong S. (2012). Microbiological quality of drinking water at Nakhon Si Thammarat Rajabhat University. Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University. 31(2): 11-21.
- O-Thong S, Jiapakdee R. & Intrasingkha N. (2003). Wastewater generated from marine shrimp feed and its treatment potential by internal filter system. Thaksin University Journal. 6(1): 41-53.
- Quyen N. T. K., Hien H. V., Khoi L. N. D., Yagi N. & Karia Lerøy Riple A. (2020). Quality management practices of intensive whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming: A study of the Mekong Delta, Vietnam. Sustainability. 12: 4520.

- Ren J., Wei C., Ma H., Dai M., Fan J., Liu Y., Wu Y. & Han R. (2019). The Nitrogen-Removal Efficiency of a novel high-efficiency salt-tolerant aerobic denitrifier, *Halomonas Alkaliphile* HRL-9, isolated from a seawater biofilter. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16(22): 4451.
- Sheela B., khasim beebi S. & Yellaji rao O. (2014). Bioremediation of ammonia using ammonia oxidizing bacteria isolated from sewage. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*. 2(4): 146-150.
- Seenivasagan R., Kasimani R., Babalola O. O., Karthika A., Rajakumar S. & Ayasamy P. M. (2017). Effect of various carbon source, temperature and pH on nitrate reduction efficiency in mineral salt medium enriched with *Bacillus weinstephensis* (DS45). *Groundwater for Sustainable Development*. 5: 21-27.
- Shahid M., Al-surhane A., Kouadri F., Ali S., Nawaz N., Afzal M., Ali B. & Soliman M. (2020). Role of microorganisms in remediation of wastewater in floating treatment wetlands: A review. *Sustainability*. 12.
- Sutin S. (2010). Water quality of mullet (*Liza oligolepis*, Bleeker, 1985) at Nakhon Si Thammarat bay, Nakhon Si Thammarat province. *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*. 29(2): 58-63.
- Tampubolon K., Zulkifli T. B. H., & Alridiwersah A. (2020). Review of Eleusine indica Weed as Heavy Metals Phytoremediator. *Agrinula: Jurnal Agroteknologi Dan Perkebunan*. 3(1): 1-9.
- Usawakesmanee N. (2016). The Use of dried water hyacinth as a feed supplement for rearing Silver barb (*Puntius gonionotus*). *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*. 35(1): 70-78.
- Wiecko G. (2003). Ocean water as a substitute for post emergence herbicides in Tropical turf. *Weed Technology*. 17: 788-791.
- Yang X.P., Wang S.M., Zhang D.W. & Zhou L.X. (2011). Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*. 102(2): 854-862.
- Zhang Q.L., Liu Y., Ai G.M., Miao L.L., Zheng H.Y. & Liu Z.P. (2012). The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylothrophicus* strain L7. *Bioresource Technology*. 108: 35-44.
- Zhao C., Yan X., Yang S. & Chen F. (2017). Screening of *Bacillus* strains from Luzhou-flavor liquor making for high-yield ethyl hexanoate and low-yield propanol. *Food Science and Technology*. 77: 60-66.