

HIỆU QUẢ LOẠI BỎ NITƠ CỦA CHỦNG *Bacillus cereus* PT1.4 BẢN ĐỊA THÔNG QUA QUÁ TRÌNH NITRATE HÓA DỊ DƯỠNG VÀ KHỬ NITƠ HIẾU KHÍ

Vũ Hùng Hải, Phan Thị Cẩm Tú, Huỳnh Trường Giang, Phạm Thị Tuyết Ngân*

Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: pttngan@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 08.09.2025

Ngày chấp nhận đăng: 10.12.2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và sàng lọc dòng vi khuẩn *Bacillus* bản địa có tiềm năng nitrat hóa và khử nitơ - hiếu khí từ bùn đáy ao nuôi tôm. Trong nghiên cứu này, 17 trong tổng số 53 chủng phân lập có khả năng khử nitrat - hiếu khí trong môi trường BTB và DM1, trong đó chủng PT1.4 đạt hiệu suất loại bỏ nitơ vượt trội nhất (92,5%). Chủng PT1.4 mang các đặc điểm hình thái và sinh hóa phù hợp với loài *Bacillus*, đồng thời đạt mức độ tương đồng 99,6% so với loài *Bacillus cereus* khi phân tích trình tự gen 16s rRNA. Trong điều kiện khử nitơ - hiếu khí, chủng PT1.4 đạt hiệu suất loại bỏ hơn 95,2% hàm lượng N-NO_2^- và 98,3% N-NO_3^- so với ban đầu sau 120 giờ. Ở điều kiện nitrat hóa dị dưỡng, hơn 91,3% hàm lượng N-NH_4^+ bị loại bỏ sau 72 giờ nuôi cấy chủng PT1.4. Ngược lại với sự gia tăng OD_{600} , hàm lượng COD_{Mn} giảm song song với sự suy giảm của các nguồn nitơ vô cơ. Điều này cho thấy chủng PT1.4 có khả năng loại bỏ các hợp chất nitơ và hữu cơ thông qua quá trình đồng hóa, kết hợp với quá trình nitrate hóa dị dưỡng - khử nitơ hiếu khí. Do đó, chủng PT1.4 là một ứng viên tiềm năng để phát triển probiotic nhằm cải thiện chất lượng môi trường nước trong các mô hình nuôi tôm thâm canh.

Từ khóa: Phân lập, *Bacillus*, nitrate hóa dị dưỡng, khử nitơ hiếu khí.

Nitrogen Removal Performance by Indigenous *Bacillus cereus* PT1.4 via Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification

ABSTRACT

This study aimed to isolate and screen indigenous *Bacillus* strains capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification from shrimp sediments. In this study, 17 out of 53 isolates were selected based on aerobic denitrification ability in BTB and DM1 media. Notably, the strain PT1.4 exhibited an outstanding efficiency of nitrogen removal (92.5%). Morphological and biochemical features of this strain were consistent with the genus *Bacillus* and the 16S rRNA gene sequencing revealed 99.6% similarity to *Bacillus cereus*. For aerobic denitrification, strain PT1.4 achieved removal efficiencies of 95.2% for N-NO_2^- concentration and 98.3% for N-NO_3^- concentration within 120 hours of incubation, whereas under heterotrophic nitrification, over 91.3% of N-NH_4^+ concentration was eliminated after 72 hours of cultivation. In contrast to the increasing OD_{600} values, the concentrations of organic matter (COD_{Mn}) decreased in parallel with the decreasing concentrations of the inorganic N sources. These findings indicate that strain PT1.4 is capable of removing both nitrogen sources and organic compounds via assimilation and heterotrophic nitrification - aerobic denitrification pathways. Hence, strain PT1.4 is considered as a promising probiotic candidate for enhancing water quality in intensive shrimp practices.

Keywords: Isolation, *Bacillus*, heterotrophic nitrification, aerobic denitrification.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trước diễn biến phức tạp của biến đổi khí hậu, ngành nuôi trồng thủy sản (NTTS) trên toàn cầu và ở Việt Nam đang hướng đến phát triển bền vững, thâm canh hóa và “Xanh hóa

vùng nuôi” dựa trên các khuôn khổ và chuẩn mực quốc tế, kết hợp với các đổi mới và tiến bộ công nghệ, nhằm đáp ứng nhu cầu thủy sản toàn cầu (FAO, 2024). Đặc điểm của mô hình nuôi thâm canh thường thả giống mật độ cao và mức tiêu thụ thức ăn lớn, nên dẫn tới sự tích lũy

đinh dưỡng ở dạng nitơ và phospho vô cơ, gây suy giảm chất lượng nước và hiện tượng phú dưỡng trong thủy vực (Pereira & cs., 2021). Trong đó, ammonia (NH_3) và nitrit (NO_2^-) là dạng nitơ có độc tính đối với động vật thủy sản, là tác nhân gây suy giảm tăng trưởng và tỷ lệ sống trên vật nuôi (Tomasso, 1994). Các giải pháp kiểm soát nitơ trong ao nuôi được áp dụng phổ biến bao gồm thay nước, sử dụng thực vật thủy sinh (tảo) hay hệ thống tuần hoàn nước (RAS). Tuy nhiên, hoạt động thay nước thường tiêu thụ một lượng lớn tài nguyên nước và tiềm ẩn nguy cơ gây ô nhiễm các nguồn nước mặt lân cận và phát tán mầm bệnh ra môi trường bên ngoài (Anh & cs., 2010). Trong khi, giải pháp sử dụng tảo có thể gây ra biến động theo chu kỳ ngày - đêm các yếu tố môi trường như oxy hòa tan, pH, NH_3 , cùng với sự dao động liên tục về mật độ tảo và nguy cơ tảo phát triển quá mức trong ao nuôi (Burford & cs., 2003). Với hệ thống RAS, nhóm vi khuẩn nitrat hóa tự dưỡng đặc trưng bởi tốc độ sinh trưởng chậm và nhạy cảm cao đối với sự biến động của môi trường. Đặc biệt, hoạt động của nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit (*Nitrospira* spp., *Nitrolancea* spp. và *Nitrobacter* spp.) bị ức chế khi môi trường phú dưỡng hoặc độ mặn tăng cao, đồng thời chịu sự cạnh tranh về oxy hòa tan và không gian cư trú với các vi khuẩn dị dưỡng khác trong môi trường (Gao & cs., 2019; Gupta & cs., 2021). Do đó cần thiết phải tìm kiếm một giải pháp thay thế phù hợp với thực trạng đang diễn ra trong các mô hình nuôi.

Gần đây, dòng vi khuẩn dị dưỡng với đặc tính nitrat hóa và khử nitơ (heterotrophic nitrification - aerobic denitrification, HNAD) thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học bởi khả năng xử lý nitơ vô cơ và hữu cơ vượt trội trong môi trường hiếu khí (Gupta & cs., 2021; Li & cs., 2024). So với nhóm tự dưỡng, vi khuẩn HNAD có tốc độ đồng hóa và xử lý trực tiếp được nhiều dạng hợp chất nitơ nhanh hơn, hạn chế sự tích lũy các sản phẩm trung gian gây độc cho thủy vực (Ebeling & cs., 2006). Một số loài HNAD được phân lập và nhận dạng thuộc dòng *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. và *Acinetobacter* sp.,... từ các nguồn nước thải, bùn đáy, nước ao

(Li & cs., 2024). Trong NTTS, *Bacillus* được sử dụng rộng rãi nhờ đặc tính sinh nội bào tử, giúp chịu đựng tốt điều kiện bất lợi và duy trì tính ổn định của lợi khuẩn trong xử lý môi trường ao nuôi. Ngoài ra, *Bacillus* phân giải hiệu quả các hợp chất hữu cơ giàu protein và carbohydrate thông qua việc tiết ra các enzyme ngoại bào mạnh (protease, amylase, cellulase,...), đồng thời sử dụng các sản phẩm phân giải làm nguồn năng lượng cho sinh trưởng (James & cs., 2021). Bên cạnh đó, khả năng loại bỏ các dạng nitơ vô cơ bởi loài *Bacillus* được ghi nhận thông qua các con đường chuyển hóa (nitrat hóa, khử nitrit hoặc nitrat) và đồng hóa, qua đó giảm sự tích lũy các chất độc hại và tác nhân gây ô nhiễm trong thủy vực (Yang & cs., 2020). Ở Việt Nam các thông tin về đặc tính HNAD trên loài *Bacillus* vẫn còn hạn chế, do đó mục tiêu của nghiên cứu nhằm phân lập và chọn lọc các chủng *Bacillus* sp. bản địa từ ao nuôi tôm nước lợ có tiềm năng xử lý đạm, qua đó không chỉ đề xuất một giải pháp cải thiện chất lượng môi trường nước trong các mô hình nuôi, mà còn góp phần làm sáng tỏ khả năng HNAD trên dòng vi khuẩn *Bacillus*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm thu mẫu

Mẫu bùn đáy được thu trong các ao nuôi tôm theo hướng quảng canh và quảng canh cải tiến thuộc tỉnh Bạc Liêu (5 mẫu), Cà Mau (15 mẫu) và Kiên Giang (10 mẫu) bằng bộ dụng cụ thu mẫu đất lõi theo thiết kế của Somsiri & cs. (2006). Cụ thể, khoảng 100g mẫu bùn ở ba vị trí khác nhau trong ao được thu ở bề mặt đáy với độ dày khoảng 5-7cm. Mẫu được đồng nhất và bảo quản ở 4°C trong túi zip để vận chuyển về phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp phân lập và sàng lọc

Vi khuẩn *Bacillus* chuyển hóa đạm trong mẫu bùn được nuôi tăng sinh và phân lập theo các bước mô tả bởi Yang & cs. (2020) với một vài thay đổi như sau: mẫu bùn sau khi đồng nhất được chuyển vào bình tam giác chứa môi trường Luria Bertani tiệt trùng với tỷ lệ 1:49 và ủ trên

máy lắc ở $28 \pm 1^\circ\text{C}$ với tốc độ 150 vòng/phút nhằm gia tăng mật độ vi khuẩn. Sau 48 giờ, tiến hành pha loãng mẫu với nước muối sinh lý (0,9% NaCl) tiệt trùng để đạt các nồng độ pha loãng 10^{-1} - 10^{-4} và xử lý nhiệt ở 80°C trong 10 phút nhằm loại bỏ tế bào sinh dưỡng (Thiery & Frachon, 1997). Kế tiếp, trải đều 100 μl mẫu pha loãng trên môi trường Tryptone Soya Agar (TSA; Himedia, Mumbai, Ấn Độ) và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc đơn được chọn và cấy rìa nhiều lần trên đĩa thạch TSA để thu khuẩn lạc thuần. Sau đó các chủng phân lập được cấy trên môi trường Bromothymol Blue (BTB; pH 7-7,2) bổ sung 1,5% agar và ủ ở 30°C trong 72 giờ. Khi môi trường BTB chuyển sang màu xanh dương, các khuẩn lạc được nuôi trong 100ml môi trường DM1 (pH 7,0) để theo dõi hàm lượng nitrate bằng phương pháp Brucine (EPA, 1983). Các chủng có hiệu suất loại bỏ hơn 80% đạm nitrat sau 5 ngày sẽ được chọn và bảo quản ở -80°C trong canh trường Tryptone Soya Broth (TSB; Himedia, Mumbai, Ấn Độ) với 20% glycerol như chất bảo quản lạnh sâu cho các đánh giá sau.

2.3. Đặc điểm nhận dạng và định danh chủng vi khuẩn

Các đặc điểm nhận dạng về hình thái khuẩn lạc, sinh lý và sinh hóa của các chủng phân lập được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan và Steel (Barrow & Feltham, 1993), so sánh với các đặc điểm nhận dạng thuộc giống *Bacillus* theo hệ thống phân loại Bergey (Logan

& Vos, 2015). Bên cạnh đó, chủng chọn lọc có hiệu suất xử lý cao nhất sẽ được gửi đến Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa (Thành phố Hồ Chí Minh) để tiến hành ly trích và giải trình tự gen 16S rRNA bằng phương pháp Sanger với cặp mồi 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') và 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') (Lane, 1991). Sau đó, chất lượng sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2%. Kết quả giải trình tự được so sánh bằng công cụ BLAST search trên ngân hàng gen của NCBI để định danh chính xác loài vi khuẩn. Các đoạn trình tự sau đó được sắp xếp bằng công cụ ClustalW để xây dựng cây phát sinh loài bằng phương pháp Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) trên phần mềm Mega v12.0 (Kumar & cs., 2024) và độ tin cậy của các mối quan hệ phả hệ được tính toán bằng kỹ thuật "bootstrap" với 1.000 lần lặp lại.

2.4. Khả năng chuyển hóa nitơ của chủng *Bacillus* chọn lọc với các nguồn nitơ khác nhau

Chủng phân lập có tốc độ loại bỏ nitrat cao nhất được phục hồi và nuôi trong canh trường TSB trên máy lắc ở $28 \pm 1^\circ\text{C}$ với tốc độ 150 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, tiến hành ly tâm với tốc độ 3.500 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút để loại bỏ dịch nuôi cấy, kế tiếp rửa tế bào hai lần và tái huyền phù với nước muối sinh lý tiệt trùng (0,9% NaCl) để đạt giá trị OD_{600} xấp xỉ 1,0.

Bảng 1. Thành phần dinh dưỡng môi trường nuôi cấy

Môi trường	Thành phần của môi trường (g/l)									BB [1%]	Vi lượng
	$\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sodium succinate)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaNO_2	NaNO_3	KH_2PO_4	Na_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	CaCl_2		
BTB	8,5	-	-	0,84	1	-	1	0,59	0,09	1ml	
NM	8,5	0,48	-	-	1,5	4	0,2	-	-	-	2ml
DM1	8,5	-	-	0,84	1,5	4	0,2	-	-	-	2ml
DM2	8,5	-	0,74	-	1,5	4	0,2	-	-	-	2ml

Ghi chú: *: Dung dịch BB 1% gồm (g/l): Bromothymol Blue 10g; **: Dung dịch vi lượng gồm (g/l): EDTA-Na 50g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,92g, CaCl_2 5,5g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5,06g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,1g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,57g và $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,61g.

Bảng 2. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu chất lượng nước

Thông số	Phương pháp
pH	Máy đo pH để bàn Lab 865 (SI Analytics, Đức)
N-NH ₄ ⁺	4500-NH ₃ F. Phenate (APHA, 2017)
N-NO ₂ ⁻	4500-NO ₂ ⁻ B. So màu Diazo (APHA, 2017)
N-NO ₃ ⁻	352.1: So màu Brucine (EPA, 1983)
COD _{Mn}	Phương pháp Kali pemanganat (Rho & cs., 2018)

Tiếp theo, cấy chuyên 1ml huyền phù tế bào vào 100ml canh trường NM, DM1 và DM2 (bổ sung 1% NaCl) chứa riêng biệt các nguồn nitơ khác nhau và ủ ở 28 ± 1°C trong điều kiện hiếu khí trên máy lắc (tốc độ 150 vòng/phút) trong 5 ngày. Trong đó, sodium succinate được sử dụng làm nguồn C kết hợp với các nguồn N khác nhau (NH₄⁺, NO₂⁻ và NO₃⁻) để đạt tỷ lệ C/N trong khoảng 10-15 nhằm kiểm tra khả năng chuyển hóa nitơ trong điều kiện hiếu khí - dị dưỡng. Mẫu được thu định kỳ mỗi ngày để xác định giá trị OD₆₀₀, pH, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ và nhu cầu oxy hóa học (COD_{Mn}) nhằm đánh giá tăng trưởng, hiệu suất và tốc độ xử lý của chủng chọn lọc. Thí nghiệm được thực hiện ba lần lặp lại đối với mỗi loại môi trường.

2.5. Phương pháp phân tích

Giá trị mật độ quang (OD₆₀₀) của huyền phù vi khuẩn được đo bằng máy so màu quang phổ UV-1900i (Shimadzu, Malaysia) ở bước sóng 600nm. Bên cạnh đó, môi trường được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để thu phần dịch nổi phân tích các thông số pH, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ và COD_{Mn} bằng các phương pháp theo mô tả trong bảng 2.

2.6. Xử lý số liệu

Hiệu suất và tốc độ xử lý đạm theo giờ được tính toán theo công thức được mô tả bởi Rout & cs. (2017). Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (SD) và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel phiên bản 2016. Dữ liệu về hiệu suất (%) được chuyển đổi sang dạng arcsin trước khi phân tích thống kê nhằm đảm bảo phân phối chuẩn và tính đồng nhất của phương sai (Gomez &

Gomez, 1984). Sự khác biệt về hiệu suất giữa các chủng được so sánh bằng phân tích phương sai một nhân tố (one-way ANOVA) kết hợp với kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa P < 0,05. Quy trình phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm IBM SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Mỹ).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và sàng lọc

Tổng cộng 53 chủng được phân lập và chọn lọc từ bùn đáy ao nuôi tôm dựa trên khả năng chịu nhiệt và đặc điểm hình thái khuẩn lạc khác nhau trên môi trường TSA. Tuy nhiên, chỉ 17 chủng (chiếm 32,1%) có khả năng phát triển và làm chuyển màu môi trường BTB từ xanh lá sang xanh dương sau 72 giờ, cho thấy đặc tính khử nitrat của các chủng phân lập (Hình 1).

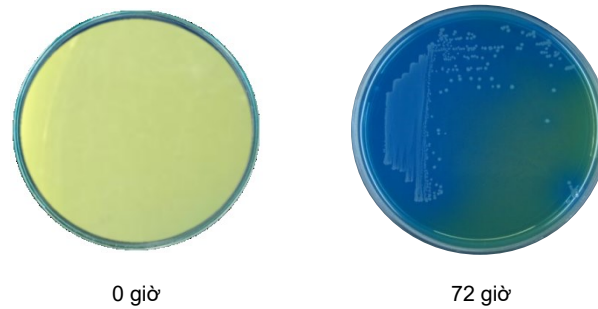
Sau 5 ngày nuôi trong môi trường DM1, chỉ 3 chủng đạt hiệu suất xử lý nitrat kém (thấp hơn 40%) và 9 chủng có khả năng khử 40-80% hàm lượng nitrat ban đầu (Hình 2A). Theo đó, 5 chủng BL8.2; PT1.4; PT8.3; TB7.2 và VT4.3 có hiệu suất loại bỏ nitrat hơn 80%, đặc biệt là chủng PT1.4 với hiệu suất cao nhất (92,5%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê (P < 0,05) so với các chủng còn lại (Hình 2B). Do đó, chủng PT1.4 được chọn để định danh và sử dụng trong các đánh giá tiếp theo.

3.2. Đặc điểm hình thái và nhận diện của chủng PT1.4

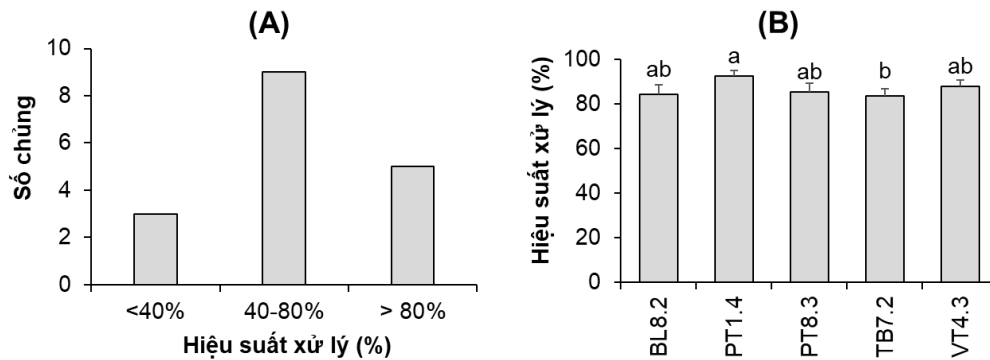
Chủng PT1.4 phát triển trên môi trường TSA có dạng khuẩn lạc lớn, bất định hình, bề mặt mô lồi với rìa gợn sóng và màu vàng nhạt (Hình 3). Khi quan sát dưới kính hiển vi, tế bào

có dạng hình que, gram dương, phản ứng dương tính với catalase và Voges-Proskauer (VP), trong khi phản ứng âm tính với oxydase, methyl

red và Indole production. Bên cạnh đó, khả năng di động và hình thành bào tử của chủng PT1.4 cũng được ghi nhận (Bảng 3).



Hình 1. Phản ứng chuyển màu môi trường BTB bởi chủng phân lập



Hình 2. Hiệu suất xử lý nitrat của các chủng phân lập (A) và các chủng chọn lọc (B)

Bảng 3. Đặc điểm nhận dạng khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn PT1.4

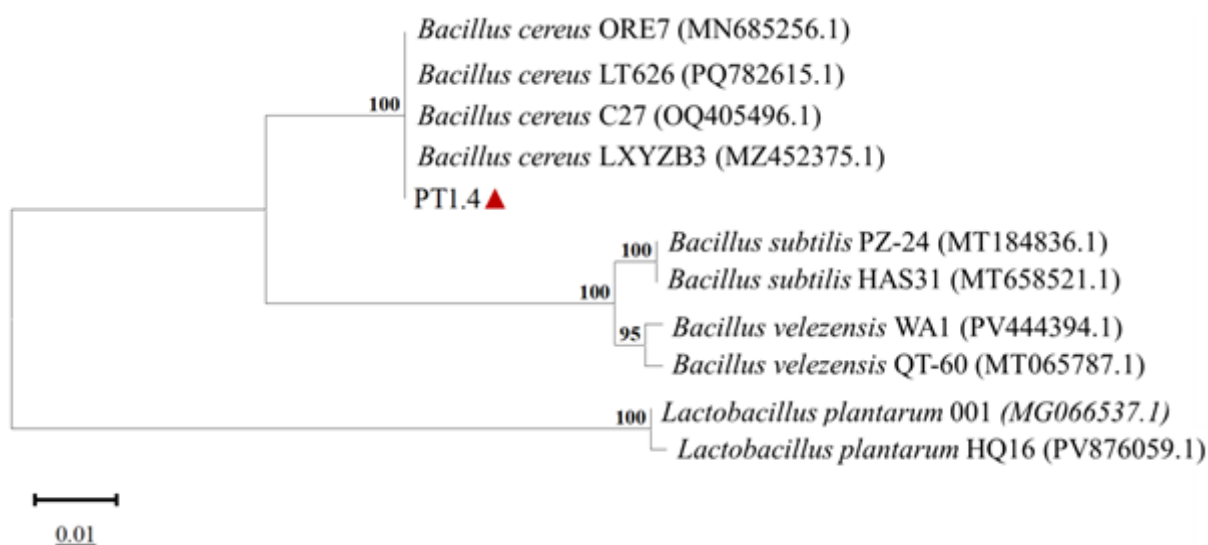
Đặc điểm	Chủng PT1.4	<i>Bacillus cereus</i> GS-5 (Rout & cs., 2017)	<i>Bacillus cereus</i> PB88 (Barman & cs., 2017)
Hình dạng khuẩn lạc	Lớn, bất định hình	Tròn	Lớn, bất định hình
Rìa	Gợn sóng	Đều	Gợn sóng
Độ nổi	Mô	Mô	Lài
Màu sắc	Vàng nhạt	Vàng nhạt	nd
Hình dạng tế bào	Que	Que	Que
Gram	+	+	+
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
Di động	+	+	+
Khả năng sinh bào tử	+	+	+
Khử nitrate	+	+	+
Methyl red test	-	-	nd
Voges-Proskauer (VP)	+	+	+
Indole production	-	-	-

Ghi chú: +: Dương tính; -: Âm tính; nd: Không xác định.

Hiệu quả loại bỏ nitơ của chủng *Bacillus cereus* PT1.4 bản địa thông qua quá trình nitrate hóa dị dưỡng và khử nitơ hiếu khí



Hình 3. Hình dạng khuẩn lạc và tế bào nhuộm gram của chủng PT1.4



Hình 4. Cây phát sinh loài từ trình tự gen 16S rRNA của chủng phân lập với các loài *Bacillus* khác

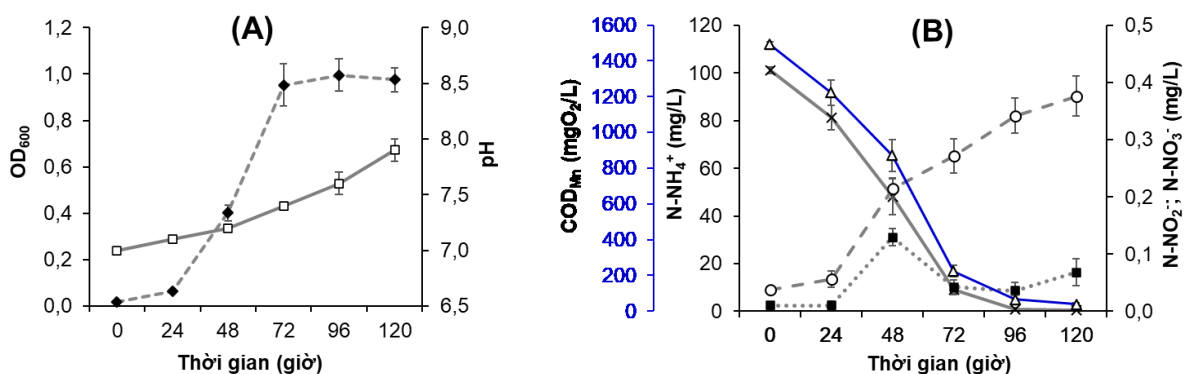
Kết quả cho thấy đoạn trình tự gen 16S rRNA của chủng PT1.4 tương đồng 99,6% với loài *Bacillus cereus* (1.413bp) trên ngân hàng gen NCBI. Bên cạnh đó, chủng PT1.4 nằm cùng nhánh với các loài *Bacillus cereus* khi phân tích cây phát sinh loài (Hình 4). Kết hợp với các đặc điểm sinh lý và hình thái, chủng PT1.4 trong nghiên cứu được nhận diện thuộc loài *Bacillus cereus*.

3.3. Khả năng chuyển hóa nitơ của chủng *Bacillus* PT1.4

3.3.1. Khả năng chuyển hóa ammonium trong môi trường NM

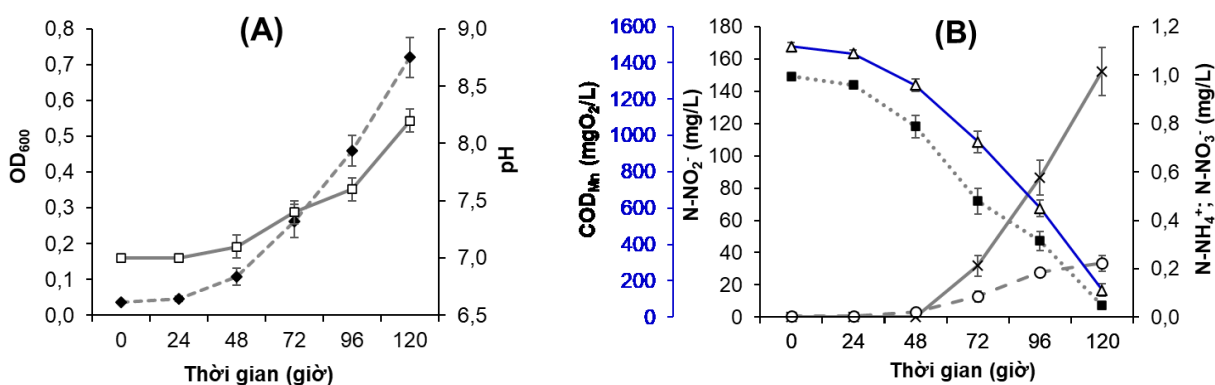
Trong điều kiện hiếu khí-dị dưỡng, hàm lượng N-NH_4^+ giảm đáng kể từ $101,3 \pm 1,4$ mg/l

còn $8,86 \pm 1,20$ mg/l sau 72 giờ, tương đương với hiệu suất xử lý 91,3% và tốc độ xử lý $1,28 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L/giờ}$ (Hình 5B). Cùng với đó, N-NO_2^- và N-NO_3^- có xu hướng tích lũy sau 48 giờ với trung bình tương ứng $0,13 \pm 0,02$ mg/l và $0,22 \pm 0,02$ mg/l. Tiếp theo đó, N-NO_2^- giảm dần, trong khi N-NO_3^- vẫn duy trì xu hướng tăng về cuối giai đoạn thí nghiệm. Bên cạnh đó, vi khuẩn đạt pha tăng trưởng trong 72 giờ đầu với giá trị OD trung bình $0,953 \pm 0,091$ và duy trì ổn định đến 120 giờ với trung bình đạt $0,975 \pm 0,053$. Giá trị pH tăng từ 7,0 đến 7,9 trong quá trình phát triển của vi khuẩn (Hình 5A). Hàm lượng COD_{Mn} giảm dần theo thời gian thí nghiệm, từ 1493 ± 15 mg/l giảm còn $39,7 \pm 7,6$ mg/l.



Ghi chú: --◆-- OD₆₀₀; --□-- pH; --×-- N-NH₄⁺; ...■... N-NO₂⁻; -○- N-NO₃⁻ và --△-- COD_{Mn}.

Hình 5. Tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn (A) và biến động hàm lượng dinh dưỡng (B) trong môi trường NM



Ghi chú: --◆-- OD₆₀₀; --□-- pH; --×-- N-NH₄⁺; ...■... N-NO₂⁻; -○- N-NO₃⁻ và --△-- COD_{Mn}.

Hình 6. Tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn (A) và biến động hàm lượng dinh dưỡng (B) trong môi trường DM2

3.3.2. Khả năng chuyển hóa nitrit trong môi trường DM2

Với nitrit ($149,3 \pm 0,7$ mg/l) là nguồn nitơ duy nhất, khả năng chuyển hóa nitơ được trình bày qua hình 6. Theo đó, khoảng 55% hàm lượng N-NO₂⁻ ban đầu bị loại bỏ sau 72 giờ tương ứng với tốc độ xử lý 1,14 mg/l/h và gần 95,2% hàm lượng bị loại bỏ sau 120 giờ với tốc độ xử lý 1,19 mg/l/h. Giá trị OD₆₀₀ tăng theo thời gian với trung bình đạt $0,721 \pm 0,056$ vào cuối giai đoạn thí nghiệm. pH có xu hướng tăng từ 7,0 đến 8,2 theo quá trình chuyển hóa. Đồng thời, hàm lượng N-NH₄⁺ và N-NO₃⁻ trung bình đạt lần lượt $1,01 \pm 0,1$ mg/l và $0,22 \pm 0,03$ mg/l

vào cuối giai đoạn thí nghiệm. Hàm lượng COD_{Mn} giảm thấp sau 120 giờ, từ 1490 ± 20 mg/l giảm còn $149,7 \pm 36,3$ mg/l.

3.3.3. Khả năng chuyển hóa nitrat trong môi trường DM1

Khi sử dụng N-NO₃⁻ ($134,8 \pm 0,3$ mg/l) làm nguồn nitơ duy nhất, khoảng 50% hàm lượng N-NO₃⁻ ban đầu bị loại bỏ sau 72 giờ với tốc độ khử là 0,93 mg/l/h và vượt 98,3% sau 120 giờ với tốc độ xử lý 1,10 mg/l/h (Hình 7). Giá trị OD₆₀₀ đạt trung bình $0,636 \pm 0,055$ sau 72 giờ và $0,906 \pm 0,041$ sau 120 giờ. Cùng đó, giá trị pH có xu hướng tăng từ 7,0 đến 8,4 theo thời gian thí nghiệm. Bên cạnh đó,

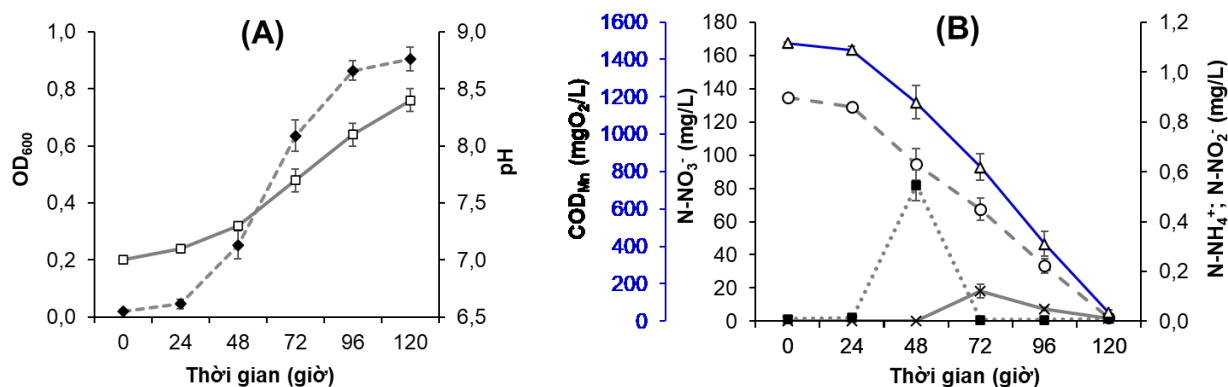
Hiệu quả loại bỏ nitơ của chủng *Bacillus cereus* PT1.4 bản địa thông qua quá trình nitrate hóa dị dưỡng và khử nitơ hiếu khí

$N-NH_4^+$ có xu hướng tích lũy với trung bình đạt $0,12 \pm 0,03$ mg/l sau 72 giờ và giảm vào cuối thí nghiệm. Tương tự, $N-NO_2^-$ tích lũy sau 48 giờ với trung bình $0,55 \pm 0,08$ mg/l nhưng sau đó giảm trở lại. Hàm lượng COD_{Mn} giảm khoảng 97% sau 120 giờ, từ 1487 ± 6 mg/l giảm còn $46 \pm 13,5$ mg/l.

4. THẢO LUẬN

Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy dòng *Bacillus* mang đặc tính HNAD có thể phân lập từ nhiều loại môi trường khác nhau. Chẳng hạn,

Yang & cs. (2020) đã sàng lọc được 21 chủng từ bùn ao nuôi tôm, cua, cá có khả năng khử nitrat bằng môi trường BTB, nhưng chỉ 4 chủng JD-005, JD-014, JD-016 và JD-017 đạt hiệu suất xử lý cao nhất. Hay nghiên cứu của Barman & cs. (2017) nhận dạng được 10 chủng từ mẫu nước và bùn đáy ao nuôi tôm sú *Penaeus monodon* dựa trên đặc tính chuyển màu trên môi trường BTB và chủng PB88 có tốc độ khử nitrat cao nhất. Trong nghiên cứu hiện tại, chỉ 17/53 chủng phát triển trên môi trường BTB sau 72 giờ, trong đó chủng PT1.4 đạt hiệu suất xử lý nitrat cao nhất (92,5%) khi nuôi trong môi trường ADM1.



Ghi chú: —◆— OD₆₀₀; —□— pH; —×— $N-NH_4^+$; ...■... $N-NO_2^-$; -○- $N-NO_3^-$ và —▲— COD_{Mn} .

Hình 7. Tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn (A) và biến động hàm lượng dinh dưỡng (B) trong môi trường DM1

Bảng 4. Tốc độ xử lý đạm của chủng PT1.4 và các chủng *Bacillus* tham khảo

Dòng vi khuẩn	Nồng độ $N-NH_4^+$ ban đầu	Tốc độ oxy hóa $N-NH_4^+$	Nồng độ $N-NO_2^-$ hoặc $N-NO_3^-$ ban đầu	Tốc độ khử $N-NO_2^-$ hoặc $N-NO_3^-$	Điều kiện nuôi cấy	Nguồn tham khảo
<i>Bacillus</i> PT1.4	101,3mg $N-NH_4^+$ /l	1,28 mg/l/h trong 72 giờ	134,8mg $N-NO_3^-$ /l 149,3mg $N-NO_2^-$ /l	1,10 mg/l/h 1,19 mg/l/h	100ml môi trường, tốc độ lắc 150rpm, 28°C trong 120 giờ	-
<i>B. cereus</i> GS-5	100mg $N-NH_4^+$ /l	2,65 mg/l/h	100mg $N-NO_3^-$ /l 50 mg $N-NO_2^-$ /l	2,69 mg/l/h 1,18 mg/l/h	100ml môi trường, tốc độ lắc 125rpm, 35°C trong 36 giờ	Rout & cs. (2017)
<i>B. amyloliquefaciens</i> N8	100mg $N-NH_4^+$ /l	1,61 mg/l/h trong 60 giờ	100mg $N-NO_3^-$ /l 100mg $N-NO_2^-$ /l	1,29 mg/l/h 1,38 mg/l/h	300ml môi trường, tốc độ lắc 140rpm, 30°C trong 72 giờ	Liu & cs. (2025)
<i>B. subtilis</i> JD-017	120mg $N-NH_4^+$ /l	0,71 mg/l/h	180mg $N-NO_3^-$ /l 110mg $N-NO_2^-$ /l	0,62 mg/l/h 0,76 mg/l/h	100ml môi trường, tốc độ lắc 200rpm, 37°C trong 120 giờ	Yang & cs. (2020)
<i>B. pumilus</i> JD-005	120mg $N-NH_4^+$ /l	0,86 mg/l/h	180mg $N-NO_3^-$ /l 110mg $N-NO_2^-$ /l	0,89 mg/l/h 0,83 mg/l/h		

Hiện tượng thay đổi màu sắc môi trường BTB từ xanh lá sang xanh dương là do sự phóng thích các sản phẩm có tính kiềm trong quá trình khử nitrat, làm gia tăng pH môi trường (Ji & cs., 2015; Yang & cs., 2020). Các đặc điểm hình thái và sinh hóa của chủng PT1.4 có sự tương đồng với các loài *B. cereus* GS-5 và *B. cereus* PB88 được phân lập trước đó (Barman & cs., 2017; Rout & cs., 2017) (Bảng 3). Theo hệ thống phân loại Bergey, vi khuẩn *Bacillus* thường có tế bào hình que, Gram dương hoặc âm (tùy thuộc vào giai đoạn phát triển), phản ứng dương tính với catalase và oxydase, có tính di động và hình thành bào tử (Logan & Vos, 2015). Hơn nữa, kết quả giải trình tự và phân tích cây phát sinh loài cho thấy chủng PT1.4 đạt mức tương đồng 99,6% và nằm cùng nhánh với loài *Bacillus cereus* (Hình 5).

Trong môi trường bổ sung N-NH_4^+ làm nguồn nitơ duy nhất, hiệu suất và tốc độ xử lý N-NH_4^+ của chủng PT1.4 (91,3% và 1,28 mg/l/h) cao hơn đáng kể so với chủng *B. subtilis* JD-017 (71% và 0,71 mg/l/h) và *B. pumilus* JD-005 (86% và 0,86 mg/l/h), nhưng thấp hơn so với chủng *B. cereus* GS-5 (95,6% và 2,65 mg/l/h) và chủng *B. amyloliquefaciens* N8 (96,5% và 1,61 mg/l/h) (Bảng 4). Trong quá trình chuyển hóa N-NH_4^+ , một lượng nhỏ N-NO_2^- và N-NO_3^- được phát hiện, đây là các sản phẩm trung gian của quá trình nitrat hóa ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$), nhưng sau đó các hợp chất này bị loại bỏ bởi các hoạt tính enzyme khử nitơ của vi khuẩn (Gupta & cs., 2021; Li & cs., 2024). Điều này trái ngược với quá trình oxy hóa N-NH_4^+ (nitrat hóa) bởi nhóm vi khuẩn tự dưỡng thường tích lũy NO_2^- và NO_3^- , đồng thời tiêu thụ nguồn kiềm (HCO_3^-) dẫn đến suy giảm pH trong môi trường (Ebeling & cs., 2006). Tuy nhiên, pH trong nghiên cứu có xu hướng tăng, có thể do quá trình khử nitơ tiếp tục diễn ra và giải phóng các gốc mang tính kiềm, từ đó làm tăng pH trong môi trường (Yang & cs., 2020). Các kết quả ghi nhận tương đồng với các nhận định trên loài *Bacillus* spp. được công bố trước đây (Rout & cs., 2017; Yang & cs., 2020; Liu & cs., 2025). Hàm lượng chất hữu cơ COD_{Mn} giảm dần theo sự gia tăng giá trị OD_{600} và sự suy giảm của nitơ trong môi trường.

Do đó, chủng PT1.4 có khả năng loại bỏ N-NH_4^+ hiệu quả thông qua các con đường đồng hóa và nitrat hóa.

Khi N-NO_2^- làm nguồn nitơ duy nhất, chủng PT1.4 cần khoảng thời gian để thích nghi với điều kiện môi trường căng thẳng, do tác động gây độc của nitrit đối với tế bào và bắt đầu pha tăng trưởng sau 48 giờ nuôi cấy. So với các báo cáo trước đây, hiệu suất xử lý và tốc độ loại bỏ N-NO_2^- (95,2% và 1,19 mg/l/h) của chủng PT1.4 vượt trội hơn so với chủng *B. subtilis* JD-017 (82,9% và 0,76 mg/l/h) và *B. pumilus* JD-005 (90,5% và 0,83 mg/l/h) và tương đồng với chủng *B. cereus* GS-5 (85,6% và 1,18 mg/l/h), nhưng thấp hơn chủng *B. amyloliquefaciens* N8 (99,2% và 1,378 mg/l/h) (Bảng 4). Cùng đó, sự tích lũy N-NH_4^+ và N-NO_3^- trong quá trình khử nitrit có thể do hoạt động oxy hóa nitrit thành nitrat ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) bởi vi khuẩn nhằm giảm độc tính của nitrit, cũng như sự phóng thích N-NH_4^+ trở lại môi trường do sự phân hủy tế bào vi khuẩn chết. Hiện tượng này tương đồng với các kết quả trước đây trên các chủng *Bacillus* spp. (Rout & cs., 2017; Yang & cs., 2020; Liu & cs., 2025). Sự suy giảm COD_{Mn} với vai trò là nguồn carbon hữu cơ cùng với sự gia tăng OD_{600} cho thấy một phần dinh dưỡng nitơ được vi khuẩn đồng hóa thành sinh khối tế bào, phần còn lại được loại bỏ thông qua các con đường chuyển hóa như khử nitrit hoặc nitrit hóa bởi các enzyme reductase hoặc enzyme oxydoreductase (Gupta & cs., 2021; Li & cs., 2024).

Tương tự, khi N-NO_3^- làm nguồn nitơ duy nhất, hiệu suất và tốc độ loại bỏ N-NO_3^- bởi chủng PT1.4 (98,3% và 1,10 mg/l/h) cao hơn so với chủng *B. subtilis* JD-017 (41,3% và 0,62 mg/l/h) và *B. pumilus* JD-005 (59,3% và 0,89 mg/l/h), gần tương tự với chủng *B. amyloliquefaciens* N8 (93,1% và 1,29 mg/l/h), nhưng thấp hơn đáng kể so với chủng *B. cereus* GS-5 (96% và 2,69 mg/l/h) (Bảng 4). Bên cạnh đó, một lượng nhỏ N-NO_2^- tích lũy trong giai đoạn 24 đến 72 giờ, đây được xem là sản phẩm trung gian của quá trình khử nitrat ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) bởi enzyme reductase do vi khuẩn tiết ra (Gupta & cs., 2021; Li & cs., 2024). Sự hiện diện của N-NH_4^+ trong môi trường chủ yếu từ nguồn dinh dưỡng phóng

thích từ các tế bào chết sau phase tăng trưởng (Rout & cs., 2017). Ngoài ra, giá trị COD_{Mn} giảm mạnh cùng với sự suy giảm N-NO₃⁻, là kết quả của quá trình đồng hóa nitơ vô cơ thành nitơ nội bào, qua đó dẫn tới sự gia tăng mật độ tế bào vi khuẩn (Rout & cs., 2017; Liu & cs., 2025).

Nhìn chung, các kết quả thu được cho thấy chủng chủng PT1.4 có tiềm năng loại bỏ hợp chất hữu cơ và các dạng hợp chất nitơ khác nhau trong điều kiện hiếu khí - dị dưỡng, đây được xem như một giải pháp sinh học ứng dụng trong quản lý chất lượng nước ao nuôi tôm thâm canh. Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu về mức độ biểu hiện gene liên quan đến các enzyme tham gia quá trình HNAD (*amo*, *hao*, *nar/nap*, *nir*, *nor* và *nos*) để làm sáng tỏ hơn về các con đường chuyển hóa và khử nitơ.

5. KẾT LUẬN

Chủng PT1.4 thuộc loài *Bacillus cereus* được phân lập từ bùn đáy ao nuôi tôm, với khả năng khử trên 90% hàm lượng nitrat ban đầu trong điều kiện hiếu khí. Hơn nữa, chủng vi khuẩn này thể hiện tốc độ tăng trưởng nhanh, cũng như tốc độ và hiệu suất xử lý nitơ và chất hữu cơ đáng kể khi được nuôi trong môi trường chỉ bổ sung N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ hoặc N-NO₃⁻ làm nguồn nitơ duy nhất. Hoạt động loại bỏ các nguồn nitơ và chất hữu cơ của chủng PT1.4 chủ yếu xuất phát từ quá trình đồng hóa các chất dinh dưỡng thành sinh khối, đồng thời gắn liền với quá trình chuyển hóa HNAD. Với những đặc tính nổi bật trên, chủng PT1.4 được xem là một ứng viên triển vọng cho các giải pháp sinh học thân thiện, góp phần duy trì chất lượng môi trường nước ổn định và nâng cao sức khỏe của đối tượng nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anh P.T., Kroeze C., Bush S.R. & Mol A.P. (2010). Water pollution by intensive brackish shrimp farming in south-east Vietnam: Causes and options for control. *Agricultural Water Management*. 97(6): 872-882.

APHA (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition. American Public Health Association, Washington, DC.

Barman P., Bandyopadhyay P., Kati A., Paul T., Mandal A.K., Mondal K.C. & Mohapatra P.K.D. (2017). Characterization and Strain Improvement of Aerobic Denitrifying EPS Producing Bacterium *Bacillus cereus* PB88 for Shrimp Water Quality Management. *Waste and Biomass Valorization*. 9(8): 1319-1330.

Barrow G.H. & Feltham R.K.A. (1993). *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*. 3rd Edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Burford M.A., Thompson P.J., McIntosh R.P., Bauman R.H. & Person D.C. (2003). Nutrient and microbial dynamics in highintensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*. 219: 393-411.

Ebeling J.M., Timmons M.B. & Bisogni J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 257(1-4): 346-358.

Environmental Protection Agency [EPA] (1983). *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development Washington, DC.

FAO (2024). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 - Blue Transformation in action*. Rome.

Gao Y., Wang X., Li J., Lee C. T., Ong P.Y., Zhang Z. & Li C. (2019). Effect of aquaculture salinity on nitrification and microbial community in moving bed bioreactors with immobilized microbial granules. *Bioresource Technology*. 297: 122427.

Gomez K.A. & Gomez A.A. (1984). *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2nd Edition., John Wiley and Sons, New York, 680p.

Gupta R., Poddar B., Nakhate S., Chavan A., Singh A., Purohit H. & Khardenavis A. (2021). Role of heterotrophic nitrifiers and aerobic denitrifiers in simultaneous nitrification and denitrification process: a nonconventional nitrogen removal pathway in wastewater treatment. *Letters in Applied Microbiology*. 74(2): 159-184.

James G., Das B.C., Jose S. & VJ R.K. (2021). *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe. *Aquaculture International*. 29(1): 323-353.

Ji B., Yang K., Zhu L., Jiang Y., Wang H., Zhou J. & Zhang H. (2015). Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 20(4): 643-651.

Kumar S., Stecher G., Suleski M., Sanderford M., Sharma S. & Tamura K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version

- 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*. 41(12): 1-9.
- Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons. Chichester. The United Kingdom. pp. 115-175.
- Li S., He Z., Li C., Lichtfouse E., Sun C., Zhang Y. & Yu J. (2024). Nitrogen removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria: A review. *Desalination and Water Treatment*. 317: 100227.
- Liu B., Liu X., Zhang W., Wang T., Tan B. & Ye C. (2025). Nitrogen removal characteristics and auto-aggregation capacity of the heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* N8. *Process Biochemistry*. 157: 256-269.
- Logan N.A. & Vos P.D. (2015). *Bacillus* †,‡. In M.E. Trujillo, S. Dedysh, P.D. Vos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey & W.B. Whitman (Eds.): *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc.
- Pereira J.C., Lemoine A., Neubauer P. & Junne S. (2021). Perspectives for improving circular economy in brackish shrimp aquaculture. *Aquaculture Research*. 53(4): 1169-1180.
- Rho T., Choi S., Kim E.S., Kang N. Y., Cho S.R., Khang S.H. & Kang D. (2018). Optimization of chemical oxygen demand determination in seawater samples using the alkaline potassium permanganate method. *Ocean Science Journal*. 53(4): 611-619. <https://doi.org/10.1007/s12601-018-0040-0>
- Rout P.R., Bhunia P. & Dash R.R. (2017). Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal. *Bioresource Technology*. 244: 484-495.
- Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-425.
- Somsiri T., Chinabu S., Phuong N.T. & Oanh D.T.H. (2006). A simple device for sampling pond sediment. *Aquaculture*. 258: 650-654.
- Thiery I. & Frachon E. (1997). Chapter III-1 - Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. In L. A. Lacey (Ed.): *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press. pp. 55-77.
- Tomasso J.R. (1994). Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*. 2(4): 291-314.
- Yang T., Xin Y., Zhang L., Gu Z., Li Y., Ding Zh. & Shi G. (2020). Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains. *Biomass and Bioenergy*. 140: 105677.