

SỰ PHÂN BỐ VÀ ĐA DẠNG VI KHUẨN ĐÔNG TỤ TRONG NƯỚC THẢI TRẠI CHĂN HEO SAU BIOGAS Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Hồ Thanh Tâm¹, Cao Ngọc Diệp²

TÓM TẮT

Một trăm hai mươi bốn dòng vi khuẩn đông tụ được phân lập trong một trăm năm mươi mẫu nước thải trại chăn nuôi heo đã qua xử lý bằng biogas ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả kiểm tra sinh hóa với dung môi p-xylene, tuyển chọn được ba mươi hai dòng vi khuẩn có hiệu suất đông tụ cao 50,1-81,8%, khi cho các dòng vi khuẩn kết cặp với nhau, chọn được bốn cặp dòng vi khuẩn có hiệu suất đông tụ đạt 71 - 88% (KG.05+VL.01; KG.05+VL.05; KG.05+ST.02; VL.01+VL.05). Bằng phương pháp sinh học phân tử xây dựng cây phát sinh loài mười tám dòng vi khuẩn phân lập dựa trên trình tự 16S rARN, liên kết với các trình tự trong cơ sở dữ liệu của GenBank để định danh vi khuẩn. Kết quả cho thấy quần thể vi khuẩn đông tụ trong nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas có sự đa dạng về loài, phần lớn thuộc lớp Bacilli (94,4%) gồm các loài *Bacillus subtilis* (5,6%), *Bacillus thuringiensis* (5,6%), *Bacillus aryabhattai* (11,1%), *Bacillus cereus* (11,1%), *Bacillus* sp. (22,2%), *Bacillus megaterium* (38,8%) và một dòng *Enterobacter* sp. (5,6%) thuộc lớp Gammaproteobacteria. Loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong quần thể vi khuẩn phân lập là *Bacillus megaterium*. Trong đó, cặp dòng *Bacillus cereus*_KG.05 với dòng *Bacillus megaterium*_VL.01 có hiệu suất đông tụ cao nhất (88%). Các loài vi khuẩn đông tụ được phân bố rộng khắp ở 13 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long.

Từ khóa: *Bacillus*, đa dạng di truyền, nước thải chăn nuôi heo, sự đông tụ, sự phân bố vi khuẩn, vi khuẩn đông tụ.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Từ lâu, vi khuẩn kết tụ sinh học (flocculation bacteria) được biết là cơ chế của quá trình kết dính trong bùn hoạt tính và màng sinh học ứng dụng xử lý nước thải. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy vi khuẩn không kết tụ (non-flocculation bacteria) lại là quần thể chiếm ưu thế trong các hệ thống sinh học xử lý nước thải (Malik *et al.*, 2003). Trong đó, vi khuẩn tạo sự đông tụ (aggregation) lại chiếm ưu thế. Đông tụ là sự kết dính giữa các tế bào vi khuẩn với nhau (cell to cell) và dính với các hạt vô cơ, hữu cơ lơ lửng, các màu, vi khuẩn khác trong môi trường. Các vật chất này được tế bào vi khuẩn đông tụ kết dính tạo thành khung xương, bên ngoài là khối nhầy. Các hạt lơ lửng cũng là nguồn dinh dưỡng giúp cho vi khuẩn phát triển và tăng sinh khối, cuối cùng khối nhầy lớn dần rồi từ từ lắng xuống đáy. Kết quả nước sáng màu, giảm lượng ô nhiễm, các huyền phù lắng xuống, nước được làm sạch. Cơ chế quá trình đông tụ là góp phần tạo thành bùn hoạt tính hay giữ vai trò quan trọng trong quá trình hình thành màng sinh

học ứng dụng xử lý nước thải (Malik *et al.*, 2003; Kimchhayarasy *et al.*, 2009). Ở đồng bằng sông Cửu Long, bên cạnh cây lúa và hoa màu khác, chăn nuôi cũng phát triển, đặc biệt là chăn nuôi heo có qui mô gia đình, để cải thiện đời sống và đáp ứng nhu cầu thịt heo cho con người. Tuy nhiên, sự phát triển nghề chăn nuôi heo đã thải ra lượng chất thải khá lớn, làm ô nhiễm môi trường, đặc biệt là môi trường nước, ảnh hưởng đến môi trường sinh thái và sức khỏe con người. Nước thải chăn nuôi là một trong những loại nước thải rất đặc trưng, có khả năng gây ô nhiễm môi trường cao bởi hàm lượng chất hữu cơ, cặn lơ lửng, N, P và sinh vật gây bệnh. Các chất thải tồn tại dưới dạng các hạt có kích thước nhỏ, khó lắng, khó có thể tách ra được bằng phương pháp cơ học và phương pháp kết tụ bằng hoá chất sẽ ảnh hưởng môi trường, còn phương pháp kết tụ sinh học lại không xử lý các hạt lơ lửng này một cách triệt để, vì vậy việc bổ sung vi khuẩn đông tụ sẽ góp phần làm giảm các cặn và phần nào làm giảm lượng N và P trong nước thải trại chăn nuôi heo. Chính vì thế, nghiên cứu các dòng vi khuẩn đông tụ giúp làm rõ hơn các đặc điểm và vai trò của chúng, đồng thời hiểu biết về sự đa dạng di truyền và sự phân bố của chúng trong môi trường để từ làm cơ sở khoa học cho việc ứng dụng

¹ Trường Cao đẳng Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Cần Thơ

nâng cao hiệu quả các quá trình sinh học trong xử lý nước thải, nhất là nước thải chăn nuôi heo, để làm cơ sở ứng dụng công nghệ sinh học vào thực tế cuộc sống, nhằm góp phần xử lý nước thải trong ngành chăn nuôi heo hiệu quả, trước khi thải ra môi trường. Mục tiêu của nghiên cứu này là: Tìm hiểu về sự phân bố và phân tích sự đa dạng di truyền các dòng vi khuẩn đồng tụ trong nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas đã tuyển chọn, từ đó xây dựng được cây phát sinh loài và định danh các dòng vi khuẩn đồng tụ ở đồng bằng sông Cửu Long.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Ba mươi hai dòng (isolate) vi khuẩn đồng tụ được phân lập và tuyển chọn trong nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas ở 13 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long có hiệu suất đồng tụ cao với dung môi p-xylene từ 50% trở lên: AG.01, AG.07, AG.08, BL.01, BL.06, BT.02, BT.05, CM.01, CM.03, CT.02, CT.03, ĐT.06, ĐT.07, HG.04, HG.09, HG.10, KG.03, KG.05, KG.09, LA.01, LA.04, ST.02, ST.04, ST.07, TG.02, TG.03, TG.09, TV.03, TV.06, VL.01, VL.05, VL.08 (Hồ Thanh Tâm và Cao Ngọc Diệp, 2013). Mẫu được bảo quản ở phòng thí nghiệm Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học Trường Đại học Cần Thơ.

2.1. Phương pháp

Phân tích mối tương đồng giữa các dòng vi khuẩn đồng tụ được tuyển chọn với các dòng vi khuẩn có ở ngân hàng dữ liệu NCBI và vẽ cây phát sinh loài: Nhân nuôi vi khuẩn trong ống nghiệm chứa môi trường LB (lỏng) để thu sinh khối. ADN vi khuẩn được tách chiết theo quy trình (Neumann *et al.*, 1992), phản ứng PCR với cặp mồi (Zhao *et al.*, 2010) có trình tự sau: 8F: 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'; 1492R: 5' - TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3'. Thành phần hóa chất cho một phản ứng PCR với nồng độ 25 µl: H₂O: 12,25 µl; buffer + (NH₄)₂SO₄: 2 µl; MgCl₂: 2 µl; dNTPs: 4 µl; 8F: 1 µl; 1492R: 1 µl; DMSO: 0,5 µl; Taq-polymeraza: 0,25 µl; ADN: 2 µl. Phản ứng PCR: 95°C/5'; 35 chu kỳ: (95°C/30", 53°C/30", 72°C/1,30"); 72°C/10; 10°C/∞'. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa 0,8% trong đệm TBE 1X có bổ sung 0,8 µl ethidium bromide, chạy điện di trên gel ở hiệu điện thế 90 V trong 90 phút. So sánh kích thước ADN của sản phẩm PCR với thang chuẩn 100 bp lus. Gel được quan sát và chụp hình dưới máy Bio-Rad Universal

HoodII. Sản phẩm PCR được tinh sạch với bộ kit Invitrogen và gửi Công ty MACROGEN (Hàn Quốc) giải trình tự. Sử dụng công cụ BLASTN để tìm sự tương đồng giữa trình tự 16S rARN của các dòng vi khuẩn phân lập với trình tự 16S rARN trên GenBank. Các trình tự tương đồng được lựa chọn là đại diện cho nhóm có quan hệ gần gũi hoặc đại diện các giống loài khác nhau. Tất cả các trình tự 16S rARN của các dòng vi khuẩn phân lập cũng như các trình tự 16S rARN thu nhận từ GenBank sẽ được so sánh cặp với nhau (multi-aligned) bằng công cụ CLUSTALW 1.6. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên khoảng cách tiến hóa bằng phần mềm phân tích MEGA 5.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura *et al.*, 2011). Định danh loài vi khuẩn phân lập dựa trên loài gần nhất trên cây phát sinh loài. Phân loại và xếp lớp vi khuẩn dựa trên Bergey's Manual of determinative Bacteriology, tái bản lần 2 (New York: Springer) (Garrrity, 2005).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Vi khuẩn đồng tụ trong nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas ở đồng bằng sông Cửu Long

Từ kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi Hồ Thanh Tâm và Cao Ngọc Diệp (2013), một trăm hai mươi bốn dòng vi khuẩn được phân lập từ 150 mẫu nước thải trại chăn nuôi heo ở 52 huyện/thị tại 13 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long, nơi không có vi khuẩn kết tụ cao, đã tiến hành nhận dạng khuẩn lạc, kiểm tra hình thái vi khuẩn, kiểm tra sinh hóa với dung môi p-xylene. Kết quả có 32/124 dòng có tính kỵ nước cao (hiệu suất đồng tụ với dung môi p-xylene từ 50% trở lên), có 71,8% là vi khuẩn gram dương, tất cả các dòng vi khuẩn phân lập đều có dạng hình que (ngắn/dài), khi xem vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 400 lần, nhận thấy tất cả vi khuẩn phân lập có khả năng chuyển động (nhANH/chẬM). Màu sắc khuẩn lạc trên môi trường thạch polypepton phần lớn có màu trắng đục, một số ít khuẩn lạc có màu trắng trong hay trắng sữa, 100% khuẩn lạc có dạng ria không đều hoặc răng cưa, thậm chí chia thùy. Độ nổi khuẩn lạc nhô hoặc lồi, điều này cho thấy các khuẩn lạc được phân lập có nhiều đặc điểm giống với khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Kích thước khuẩn lạc sau 24 giờ cấy trên môi trường thạch polypepton, dao động từ 0,68 đến 1,69 mm (bảng 1).

Bảng 1: Hình thái 32 dòng vi khuẩn đồng tụ phân lập ở nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas có hiệu suất đồng tụ cao với dung môi p-xylene

STT	Dòng vi khuẩn phân lập	Màu sắc, hình dạng khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Kích thước khuẩn lạc nuôi 24 giờ (mm)	Nhuộm gram	Hiệu suất đồng tụ với p-xylene (%)
1	AG.01	Trắng trong, bìa nguyên, lồi, ít nhầy	/, +	1,06	Âm	64
2	AG.07	Trắng vàng, rìa cạn, lồi, ít nhầy	O, -	0,86	Dương	62
3	AG.08	Trắng trong, bìa nguyên, mô, nhầy	O, -	1,66	Dương	70
4	BL.01	Trắng trong, bìa nguyên, lồi, nhầy	/, +	1,26	Dương	70
5	BL.06	Trắng đục, rìa sâu, mô, nhầy	/, -	0,93	Âm	59
6	BT.02	Trắng trong, bìa nguyên, lồi, ít nhầy	O, -	0,90	Dương	70
7	BT.05	Trắng vàng, rìa cạn, mô, nhầy	/, +	1,16	Dương	71
8	CM.01	Trắng đục, rìa cạn, mô, khô	/, -	0,73	Dương	65
9	CM.03	Trắng đục, rìa cạn, lồi, ít nhầy	O, -	0,86	Dương	71
10	CT.02	Trắng trong, bìa nguyên, lồi, nhầy	/, +	0,33	Âm	71
11	CT.03	Trắng sữa, rìa cạn, mô, khô	/, +	1,10	Dương	66
12	DT.06	Trắng trong, bìa nguyên, lồi, ít nhầy	O, +	0,36	Dương	65
13	DT.07	Trắng sữa, bìa nguyên, khô, nhầy	/, -	0,87	Âm	51
14	HG.04	Trắng trong, rìa cạn, mô, nhầy	O, +	1,10	Dương	71
15	HG.09	Trắng vàng, rìa cạn, mô, ít nhầy	/, +	1,06	Âm	65
16	HG.10	Trắng vàng, rìa cạn, mô, ít nhầy	/, -	1,23	Dương	73
17	KG.03	Trắng trong, bìa nguyên, mô, khô	/, -	1,33	Dương	65
18	KG.05	Trắng đục, rìa cạn, mô, nhầy	/, +	1,5	Dương	82
19	KG.09	Trắng sữa, rìa cạn, mô, nhầy	/, -	1,13	Âm	51
20	LA.01	Trắng đục, rìa cạn, mô, khô	/, +	1,06	Âm	53
21	LA.04	Trắng đục, rìa cạn, mô, khô	O, -	1,10	Dương	59
22	ST.02	Trắng đục, rìa sâu, mô, nhầy	/, +	1,10	Dương	77
23	ST.04	Trắng trong, bìa nguyên, lồi, ít nhầy	/, +	0,4	Dương	69
24	ST.07	Trắng trong, bìa nguyên, lồi, khô	/, +	1,03	Âm	70
25	TG.02	Trắng trong, bìa nguyên, mô, ít nhầy	O, -	0,96	Dương	71
26	TG.03	Trắng sữa, rìa sâu, mô, nhầy	/, +	1,06	Âm	55
27	TG.09	Trắng vàng, rìa cạn, lồi, ít nhầy	O, -	1,10	Dương	72
28	TV.03	Trắng trong, rìa cạn, lồi, ít nhầy	/, -	1,20	Dương	58
29	TV.06	Trắng trong, rìa cạn, mô, ít nhầy	/, +	1,16	Dương	70
30	VL.01	Trắng đục, rìa cạn, mô, nhầy	/, +	1,06	Dương	74
31	VL.05	Trắng đục, rìa cạn, mô, nhầy	/, +	1,13	Dương	73
32	VL.08	Trắng trong, rìa cạn, lồi, ít nhầy	/, -	1,40	Dương	70

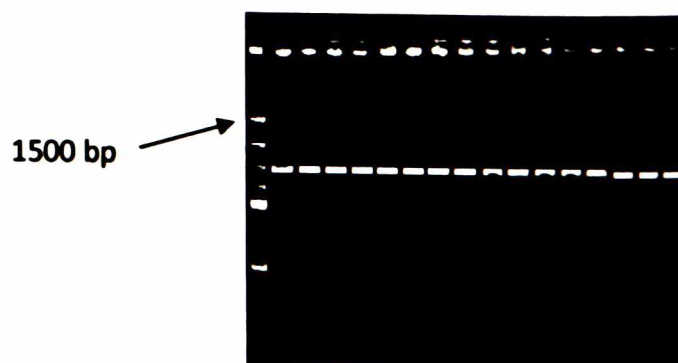
* Ghi chú: Hình que (/); hình cầu (O); chuyển động (+), ít chuyển động (-)

(Hồ Thanh Tâm và Cao Ngọc Diệp, 2013)

3.2. Mối quan hệ phát sinh loài và sự phân bố các dòng vi khuẩn đồng tụ trong nước thải chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long

Gien 16S rARN là đoạn gien bảo thủ cao, đặc trưng cho từng loài vi khuẩn, do vậy trình tự của nó thường được sử dụng để phân loại các chủng vi khuẩn đến loài. Bằng kỹ thuật sinh học phân tử tiến hành tách chiết ADN, nhân đoạn gien 16S rARN 32 dòng vi khuẩn có bề mặt tế bào kỵ nước và hiệu suất tự đồng tụ cao, được phân lập từ nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas. Sản phẩm PCR được điện di trên agarosa nồng độ 0,8%, kết quả chọn được 18 dòng vi khuẩn phân lập đều có băng ở vị trí 1500 bp ở

cặp mồi 8F và 1492R với thang chuẩn so sánh là 100 bp plus (Hình 1).



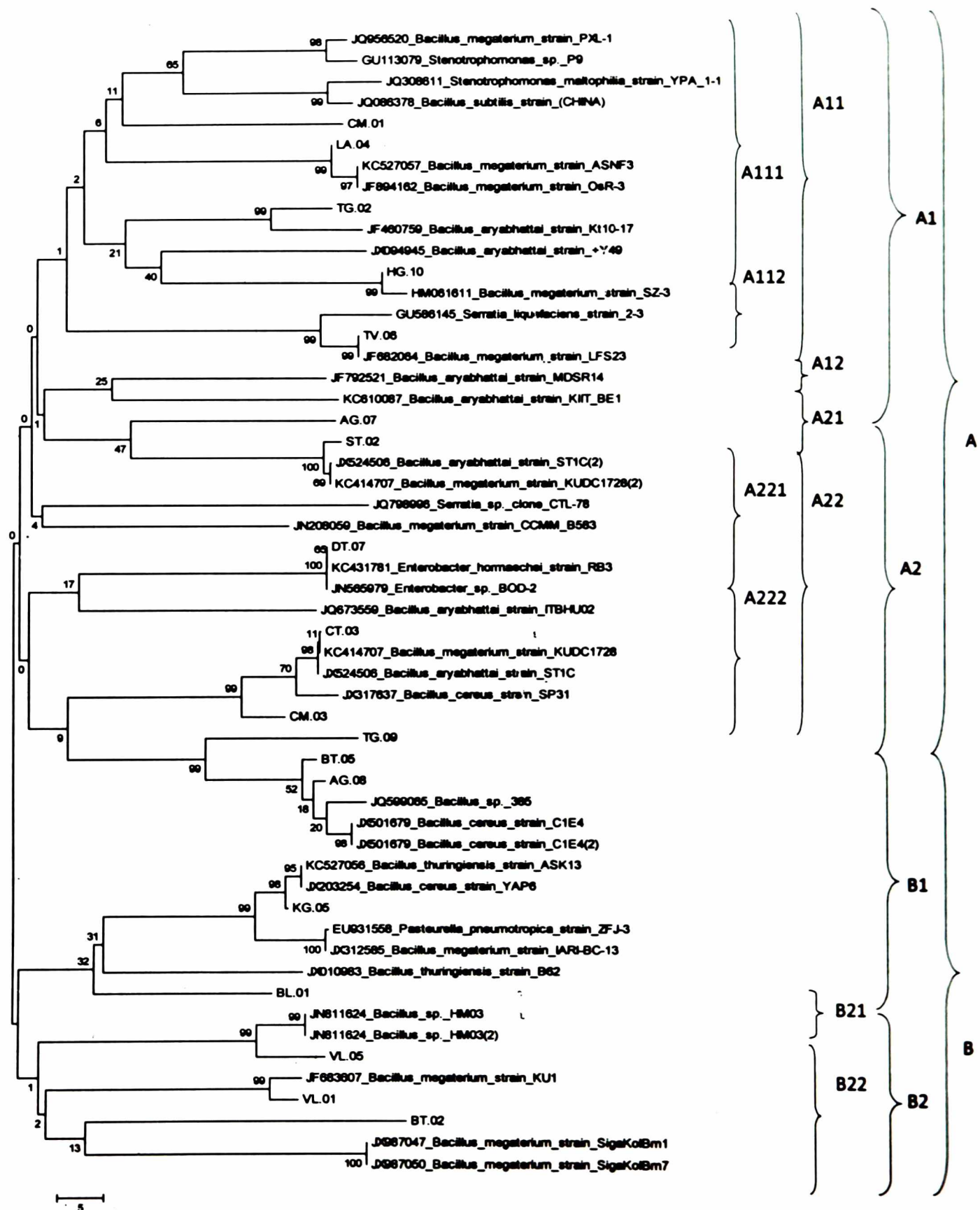
Hình 1: Hình gel của 16/18 dòng vi khuẩn đồng tụ được tuyển chọn có băng 1500 bp

Bảng 2: Kết quả mối tương quan di truyền các dòng vi khuẩn đông tụ phân lập với các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng gen (NCBI)

Các dòng vi khuẩn phân lập	Chiều dài (bp)	Đại diện loài có quan hệ gần gũi	Mã số	Tỉ lệ tương đồng (%)
TG.09	1346	<i>Bacillus megaterium</i> strain CCMM B583	JN208059	99
BL.01	1426	<i>Bacillus megaterium</i> strain SigaKolBm1	JX987047	98
CM.03	1271	<i>Bacillus megaterium</i> strain KU1	JF683607	98
CT.03	1420	<i>Bacillus megaterium</i> strain KUDC1728	KC414707	99
HG.10	1408	<i>Bacillus megaterium</i> strain SZ-3	HM061611	99
LA.04	1383	<i>Bacillus megaterium</i> strain ASNF3	KC527057	99
ST.02	1390	<i>Bacillus aryabhattai</i> strain ST1C	JX524506	99
CM.01	1302	<i>Bacillus megaterium</i> strain SigaKolBm7	JX987050	99
VL.01	1238	<i>Bacillus subtilis</i> strain B7	JQ086378	99
TV.06	1297	<i>Bacillus megaterium</i> strain LFS23	JF682064	99
VL.05	1192	<i>Bacillus aryabhattai</i> strain +Y49	JX094945	98
KG.05	1408	<i>Bacillus cereus</i> strain YAP6	JX203254	99
AG.07	1203	<i>Bacillus</i> sp. 385	JQ599065	99
AG.08	1027	<i>Bacillus</i> sp. HM03	JN811624	99
BT.05	1029	<i>Bacillus</i> sp. HM03	JN811624	98
DT.07	1343	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain RB3	KC431781	99
BT.02	1179	<i>Serratia liquefaciens</i> strain 2-3	GU586145	99
TG.02	1418	<i>Stenotrophomonas</i> sp. P9	GU113079	99

Mười tám dòng vi khuẩn này được đại diện là vi khuẩn đông tụ trong 13 tỉnh, thành đồng bằng sông Cửu Long gồm các dòng TG.02, TG.09 (Tiền Giang), BL.01 (Bạc Liêu), CM.01, CM.03 (Cà Mau), CT.03 (thành phố Cần Thơ), HG.10 (Hậu Giang), LA.04 (Long An), ST.02 (Sóc Trăng), VL.01, VL.05 (Vĩnh Long), TV.06 (Trà Vinh), KG.05 (Kiên Giang), AG.07, AG.08 (An Giang), BT.02, BT.05 (Bến Tre), DT.07 (Đồng Tháp). Kết quả này bước đầu cho thấy vi khuẩn đông tụ trong nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas được phân bố ở khắp 13 tỉnh, thành đồng bằng sông Cửu Long không phụ thuộc vào đặc điểm địa lý và khí hậu hay cấu trúc hầm xử lý biogas. Sau khi định danh bằng phương pháp sinh hóa và sinh học phân tử, sản phẩm PCR được gửi giải trình tự 16S rARN tại Công ty MACROGEN (Hàn Quốc) và phân tích kết quả trên cơ sở dữ liệu NCBI, sử dụng công cụ Blast N để so sánh mức độ tương đồng các dòng vi khuẩn. Theo

Rowland và Taber (1996), nếu tỷ lệ tương đồng của trình tự 16S rARN trên 99%, chúng ta hoàn toàn có thể kết luận rằng 2 chủng thuộc về cùng một loài, tỷ lệ tương đồng 97-99% thì 2 chủng được phân loại là cùng một giống hoặc cùng một họ và nếu tỷ lệ tương đồng của trình tự 16S rARN nhỏ hơn 97% thì hai chủng thuộc về hai loài khác nhau. Các trình tự ADN của 18 dòng vi khuẩn đông tụ được tuyển chọn có băng tương đồng ở mức 1500 bp được sử dụng các đoạn gen 16S rARN này để so sánh với trình tự đoạn gen 16S rARN các dòng vi khuẩn có trong cơ sở dữ liệu NCBI. Mỗi dòng vi khuẩn phân lập chọn hai dòng vi khuẩn trong cơ sở dữ liệu NCBI có trình tự gen tương đồng từ 98% trở lên để phân tích mối quan hệ gần gũi và định danh các dòng vi khuẩn (Bảng 2), từ đó xây dựng cây phát sinh loài tương quan 18 dòng vi khuẩn phân lập và 36 dòng vi khuẩn tương đồng trong cơ sở dữ liệu NCBI (Hình 2).

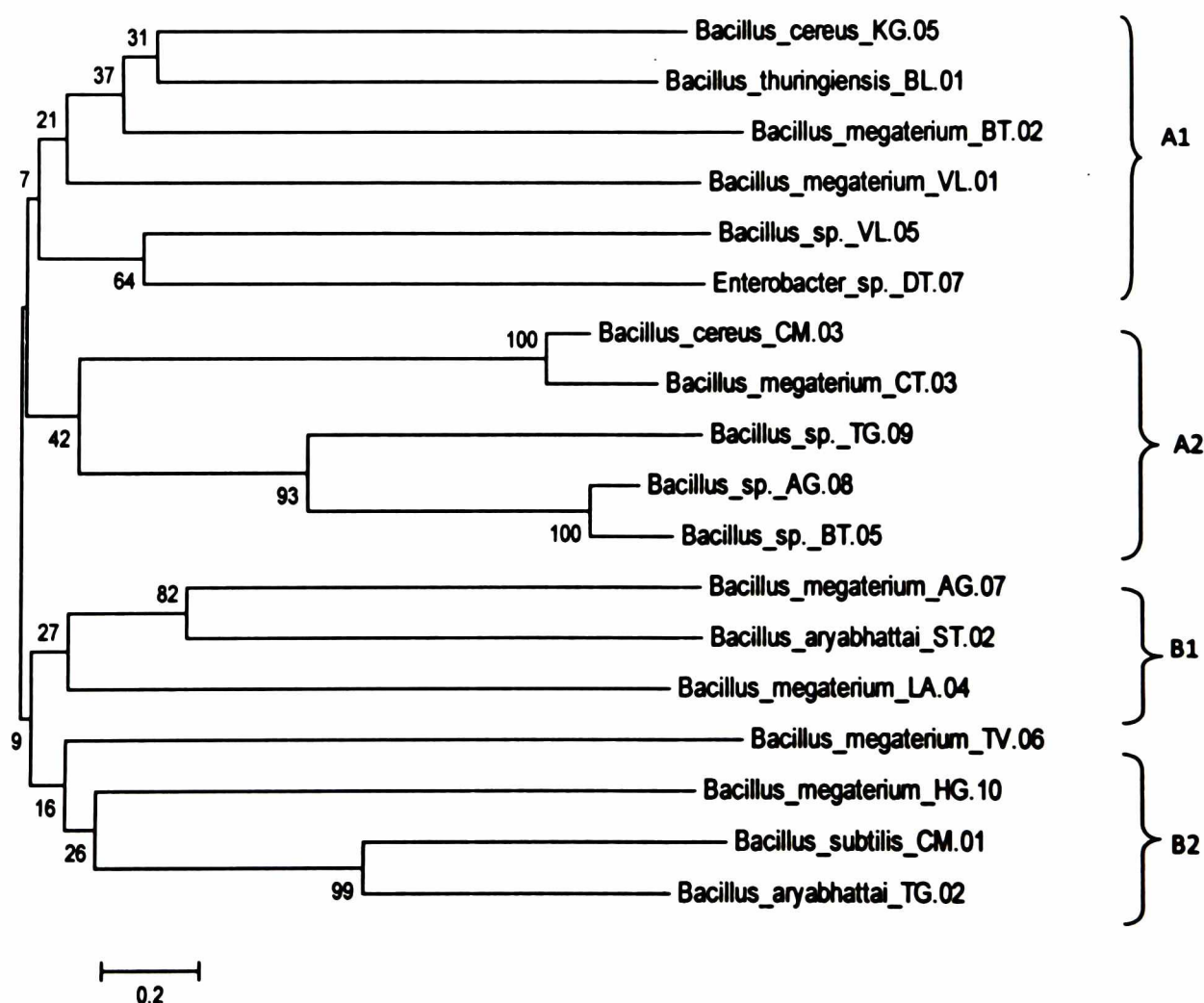


Hình 2: Cây phát sinh loài dạng Neighbor-joining 1000 lần lặp lại (bootstrap), xây dựng trên trình tự 16S rARN của 18 dòng vi khuẩn đồng tự phân lập từ mẫu chất thải trại chăn nuôi heo ở ĐBSCL với 36 dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI

Hình 2 cho thấy, các dòng vi khuẩn trong cây phát sinh loài rất đa dạng về chủng loài nhưng phần lớn thuộc lớp bacilli, họ Bacillaceae, chi *Bacillus* gồm các dòng: *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus* sp., ngoài ra còn có 4 dòng

không thuộc chi *Bacillus* là dòng *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Pasteurella* thuộc lớp Gammaproteobacteria, họ Enterobacteriaceae. Cây phát sinh loài phân ra 2 nhánh lớn (cluster) A và B mỗi nhánh lớn có nhiều nhánh nhỏ hơn: nhánh A1 có 24 dòng, trong đó có 7 dòng vi khuẩn phân lập CM.01, LA.04, TG.02, HG.10, TV.06, AG.07, ST.02 tất cả đều có quan hệ gần gũi với vi khuẩn thuộc lớp bacilli gồm các dòng *Bacillus megaterium*, *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus subtilis*; nhánh A2 có 15 dòng vi khuẩn trong đó có 6 dòng vi khuẩn phân lập gồm các

dòng DT.07, CM.03, CT.03, TG.09, BT.05 và AG.08, có 5 dòng có mối quan hệ gần gũi với lớp bacilli gồm các dòng *Bacillus megaterium*, *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus cereus* và *Bacillus* sp., chỉ có 01 dòng DT.07 quan hệ gần gũi với lớp Gammaproteobacteria thuộc chi *Enterobacter*, nhánh B1 có dòng 7 dòng, trong đó có 2 dòng vi khuẩn phân lập là KG.05 và BL.01 nhánh B2 có 8 dòng, trong đó có 3 dòng vi khuẩn phân lập là VL.01, VL.05 và BT.02 cả hai nhánh B1 và B2 các dòng vi khuẩn phân lập đều có quan hệ gần gũi với lớp bacilli, chi *Bacillus*.



Hình 3 : Cây phát sinh loài dạng Neighbor-joining 1000 lần lặp lại (bootstrap), xây dựng trên trình tự 16S rARN của 18 dòng vi khuẩn đồng tụ phân lập từ mẫu chất thải trại chăn nuôi heo ở ĐBSCL

Trên cơ sở mối quan hệ gần gũi của các dòng vi khuẩn phân lập với các dòng vi khuẩn có trong cơ sở dữ liệu NCBI đây cũng là cơ sở để định danh cho các dòng vi khuẩn phân lập ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Các trình tự gen 16S rARN của 18 dòng vi khuẩn đồng tụ phân lập cũng được xây dựng cây phát sinh loài đặc trưng cho các dòng vi khuẩn đồng tụ trong nước thải chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long (Hình 3) cho thấy các dòng vi khuẩn đồng tụ

bản địa cũng phân thành 2 nhánh lớn và nhiều nhánh nhỏ, phần lớn thuộc lớp bacilli, chi *Bacillus* gồm một dòng *Bacillus subtilis* là *Bacillus _ subtilis _ CM01* (5,6%); một dòng *Bacillus thuringiensis* là *Bacillus thuringiensis _ BL.01* (5,6%); hai dòng *Bacillus aryabhattai* (11,1%) là *Bacillus _ aryabhattai _ ST.02*, *Bacillus _ aryabhattai_TG.02*; hai dòng *Bacillus cereus* (11,1%) là *Bacillus _ cereus _ KG.05*, *Bacillus _ cereus _ CM.03*; bốn dòng *Bacillus* sp. (22,2%) là *Bacillus*

sp._TG.09, *Bacillus* sp._BT.05, *Bacillus* sp._AG.08, *Bacillus* sp._VL.05; bảy dòng *Bacillus megaterium* (38,8%) là *Bacillus _ megaterium*_BT.02, *Bacillus _ megaterium _ VL.01*, *Bacillus _ megaterium _ CT.03*, *Bacillus _ megaterium _ AG.07*, *Bacillus_megaterium-LA.04*, *Bacillus _ megaterium _ TV.06*, *Bacillus _ megaterium _ HG.10* và một dòng *Enterobacter* sp._DT.07 (5,6%) thuộc lớp Gammaproteobacteria. Trong đó dòng vi khuẩn chiếm ưu thế trong quần thể vi khuẩn phân lập trong nước thải trại chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long là dòng *Bacillus megaterium*. Kết quả kiểm tra sinh hóa sự đông tụ từng cặp các dòng vi khuẩn với nhau kết quả tuyển chọn được 4 dòng thuộc *Bacillus* hiện diện ở 3 tỉnh có hiệu suất đông tụ cao là dòng *Bacillus cereus*_KG.05 thuộc tỉnh Kiên Giang, dòng *Bacillus megaterium*_VL.01 và dòng *Bacillus* sp._VL.05 thuộc tỉnh Vĩnh Long, dòng *Bacillus aryabhattai*_ST.02 thuộc tỉnh Sóc Trăng. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Lương Đức Phẩm (2009) chi *Bacillus* là trực khuẩn gram dương rất phổ biến trong tự nhiên, sống hiếu khí hoặc kỵ khí tùy tiện, thích hợp với nhiệt độ từ 25 đến 45°C và là một trong những dòng vi khuẩn chính có trong cộng đồng vi khuẩn ở bùn hoạt tính tham gia vào quá trình làm sạch nước. Nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn tham gia quá trình xử lý nước thải là 25°C đến 35°C, giới hạn nhiệt độ này rất phù hợp với khí hậu ở đồng bằng sông Cửu Long.

Bốn dòng vi khuẩn đông tụ (KG.05+VL.01; KG.05+VL.05; KG.05+ST.02; VL.01+VL.05) được tuyển chọn làm dòng vi khuẩn giữ vai trò chính để tạo sự đông tụ trong nước thải chăn nuôi heo sau biogas ở đồng bằng sông Cửu Long thuộc chi *Bacillus*. Trong đó có dòng *Bacillus cereus*_KG.05 có hiệu suất tự đông tụ cao nhất (87,2%) so với các dòng còn lại. Kết quả này phù hợp với kết quả của Kimchhayarasy *et al.* (2009) cho thấy dòng *Bacillus cereus* S24 có tỷ lệ kết dính rất cao với 2 dòng *Acinetobacter johnsonii* S35 và *Acinetobacter junii* S33 và cao nhất so với các dòng còn lại được phân lập trong bùn hoạt tính.

4. KẾT LUẬN

Vi khuẩn đông tụ trong nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas được phân bố rộng ở 13 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả phân lập được 124 dòng vi khuẩn đông tụ, bằng kỹ thuật kiểm tra sinh hóa tuyển chọn được 32 dòng có hiệu suất đông tụ cao với dung môi p-xylene (từ 51% trở lên). Bằng phương pháp sinh học phân tử xây dựng được cây

phát sinh loài gồm 18 dòng vi khuẩn phân lập với 36 dòng vi khuẩn trong GenBank, định danh và xây dựng cây phát sinh loài 18 dòng vi khuẩn phân lập, cho thấy quần thể vi khuẩn đông tụ trong nước thải trại chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long rất đa dạng về chủng loài, phần lớn thuộc lớp Bacilli, chi *Bacillus*, gồm các dòng *Bacillus subtilis* và *Bacillus thuringiensis* (5,6%), *Bacillus aryabhattai* và *Bacillus cereus* (11,1%), *Bacillus* sp. (22,2%), *Bacillus megaterium* (38,8%), chỉ có một dòng *Enterobacter* sp. (5,6%) thuộc lớp Gammaproteobacteria, dòng vi khuẩn chiếm ưu thế trong quần thể vi khuẩn phân lập thuộc dòng *Bacillus megaterium*. Bốn cặp dòng vi khuẩn có hiệu suất đông tụ cao 71-88% (KG.05+VL.01; KG.05+VL.05; KG.05+ST.02; VL.01+VL.05) đều là những dòng thuộc chi *Bacillus* có trong ba tỉnh Kiên Giang, Sóc Trăng và Vĩnh Long. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu, các dòng vi khuẩn phân lập, được xem là các đại diện cho cộng đồng vi khuẩn đông tụ trong nước thải trại chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2000. *Giáo trình thực tập vi sinh vật học*. NXB Đại học Cần Thơ.
2. Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002. *Thực tập vi sinh vật đại cương*. NXB Đại học Cần Thơ.
3. Endo, T., K. Nakamura, and H. Takahashi, 1976. Pronase-susceptible floc forming bacteria: relationship between flocculation and calcium ion. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 2289-2295.
4. Garrity G. M., 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition (New York: Springer).
5. Hồ Thanh Tâm và Cao Ngọc Diệp, 2013. Vi khuẩn đông tụ (aggregation) trong nước thải trại chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long. *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2013*, quyển 2, trang 518-522.
6. Hoben H. and P. Somasegaran, 1982. Comparison of the Pour, Dspread, and Drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. In inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1246-1247.
7. Kimchhayarasy, P., K. Kakii and T. Nikata, 2009. Intergeneric coaggregation of non-flocculating *Acinetobacter* spp. isolates with other sludge

constituting bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107 (4): 394-400.

8. Kinder, S. A. and S. C. Holt, 1993. Localization of the *Fusobacterium nucleatum* T18 adhesin activity mediating coaggregation with. *Porphyromonas gingivalis* T22, *J. Bacteriol.* 175, 840-850.

9. Lương Đức Phẩm, 2009. *Công nghệ xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học*. NXB Giáo dục Việt Nam.

10. Malik, A., M. Sakamoto, S. Hanazaki, M. Osawa, T. Suzuki, M. Tochigi, and K. Kakii, 2003. Coaggregation among nonflocculating bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6056-6063.

11. Neumann, B., A. Pospiech and H. Chairrer, 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram - negative bacteria. *Trends Genet.* 8, 332-333.

12. Rosenberg, M., D. Gutnik and E. Rosenberg, 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29-33.

13. Rowland B. M. and H. W. Taber, 1996. Duplicate isochorismate synthase genes of *Bacillus*

subtilis. Regulation and involvement in biosynthesis of menaquinone and dihydroxybenzoate. *J. bacteriol.* 178: 854 – 861.

14. Sanginur, R., M.St Denis, W. Ferris Aaron, F. Chan and C. Lee, 2006. Multicombination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant associated infections. *Antimicrob. Agent Chemother.* 50: 55-61.

15. Shanzitki, B., D. Hurwitz, N. Smorodin N. Ganeshkumar, and E. I. Weiss, 1991. Identification of a *Fusobacterium nucleatum* PK1 galactose-binding adhesin which mediates coaggregation with periodontopathogenic bacteria hemagglutination. *Infect Immun.* 65: 5231-5237.

16. Tamura K., D. Peterson, N. Peterson Stecher, M. Nei and S. Kumar, 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.

17. Zhao, B., Y. L. He, J. Huuqhes and X. Zhang, 2010. Heterotrophic nitrogen removal by newly isolated *Acinetobacter calcoaceticus* H. *Bioresour. Technology*. 101, 5194-5200.

DISTRIBUTION AND DIVERSITY ANALYSIS OF BACTERIA AGGREGATION IN PIGGERY WASTEWATER AFTER TREATED BIOGAS IN THE MEKONG DELTA

Ho Thanh Tam, Cao Ngoc Diep

Summary

One hundred of twenty-four bacterial isolates were isolated from one hundred of fifty piggery wastewater samples of swine lagoon effluent treated by biogas in 13 provinces of the Mekong delta. The results of biochemical with p-xylene solvent were selected thirty two strains have high coagulation efficiency [reaches to 50.1 to 81.8%, while for the strain associated with each choice pair four strain pairs coagulation performance gain from [reaches to 71-88%] (VL.01+KG.05; KG.05+VL.05; KG.05+ST.02; VL.01+VL.05). The molecular biology techniques phylogenetic tree construction of eighteen bacterial strains isolated based on 16S rRNA sequences, sequences linked in the GenBank database showed that that bacterial aggregation population in piggery wastewater in the provinces of the Mekong delta majority of classes bacilli (94.4%), including strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* (5.6%), *Bacillus cereus* and *Bacillus aryabhattai* (11.1%), *Bacillus* sp. (22.2%), *Bacillus megaterium* (38.9%), and a gamma-proteobacteria class strain of *Enterobacter* sp. (5.6%), the predominant isolated strain of bacteria aggregation was *Bacillus megaterium*. In particular, the pair of strain with the *Bacillus cereus*_KG.05, *Bacillus megaterium*_VL.01 has the highest coagulation efficiency (88%). From these results showed that the strains of bacteria aggregation distribute in the piggery wastewater in 13 provinces of the Mekong delta extensively.

Keywords: Aggregation, *Bacillus*, bacteria aggregation, genetic diversity, hydrophobic characteristic, piggery wastewater.

Người phản biện: PGS.TS. Cù Hữu Phú

Ngày nhận bài: 07/02/2014

Ngày thông qua phản biện: 07/3/2014

Ngày duyệt đăng: 14/3/2014