

TIỀM NĂNG XỬ LÝ ĐỒNG THỜI NITƠ VÀ PHOSPHO BỞI DÒNG PSEUDOMONAS STUTZERI CM-11HN PHÂN LẬP TỪ AO TÔM POTENTIAL OF SIMULTANEOUS NITROGEN AND PHOSPHORUS REMOVAL BY PSEUDOMONAS STUTZERI CM-11HN ISOLATED FROM SHRIMP POND

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

Trường Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ

Tác giả liên hệ: Vũ Hùng Hải; Email: vhhai@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 06/10/2024; ngày phản biện thông qua: 14/04/2025; ngày duyệt đăng: 20/05/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm phân lập và chọn lọc các dòng *Pseudomonas* sp. bản địa có khả năng xử lý đồng thời nitơ (N) và phospho (P) từ các ao nuôi tôm quảng canh và quảng canh cải tiến. Tổng cộng 16 chủng phân lập có khả năng khử nitrate, nhưng chỉ 4 chủng đạt hiệu suất xử lý $N-NO_3^-$ hơn 80% trong môi trường ADM-1, trong đó chủng CM-11HN đạt hiệu suất xử lý cao nhất. Kết quả giải trình tự gen 16s rRNA cho thấy chủng CM-11HN có độ tương đồng đạt 99,9% với các loài *Pseudomonas stutzeri*. Trong điều kiện khử-hiếu khí, chủng CM-11HN đạt hiệu suất xử lý N (nồng độ ban đầu khoảng 100 mg/L) hơn 90% với $N-NO_3^-$ hoặc $N-NO_2^-$ là nguồn đạm duy nhất, tương ứng với hiệu suất xử lý P (nồng độ ban đầu khoảng 20 mg/L) lần lượt là 72,9% và 51,3%. Khi $N-NH_4^+$ là nguồn đạm duy nhất, hiệu suất xử lý N và P bởi chủng CM-11HN đạt lần lượt là 96,5% và 78%. Trong số các nguồn nitơ thì $N-NH_4^+$ được vi khuẩn ưu tiên sử dụng hơn so với $N-NO_3^-$ và $N-NO_2^-$. Hơn nữa, chủng CM-11HN không biểu hiện hoạt tính tiêu huyết và không gây chết tôm *Litopenaeus vannamei* trong đánh giá in vivo. Do đó, chủng *Pseudomonas stutzeri* CM-11HN có tiềm năng ứng dụng như giải pháp sinh học trong xử lý nước thải và cải thiện chất lượng nước ao nuôi thủy sản.

Từ khóa: *Pseudomonas*, xử lý nitơ & phospho, nitrate hóa, khử nitrate.

ABSTRACT

This study aims to isolate and select indigenous *Pseudomonas* strains that are capable of simultaneously removing nitrogen (N) and phosphorus (P) from extensive and improved extensive shrimp ponds. A total of 16 isolates were capable of reducing nitrate, but only 4 strains performed the NO_3^- -N removal efficiency of above 80% in ADM-1 medium, of which strain CM-11HN possessed the highest efficiency. The 16S rRNA gene sequence analysis showed that strain CM-11HN shared a homology of up to 99.9% with *Pseudomonas stutzeri*. In aerobic denitrifying, over 90% of N concentrations were removed while NO_3^- -N or NO_2^- -N as the sole nitrogen, and the corresponding P removal efficiencies were 72.9% and 51.3%. When NH_4^+ -N as the sole source, the maximum N and P removal efficiencies observed for this candidate were about 96.5% and 78%, respectively. Among nitrogen sources, NH_4^+ -N was preferentially utilized during the cell growth phase compared to NO_3^- -N and NO_2^- -N. Moreover, strain CM5.2N did not exhibit hemolytic activity and none of the dead shrimp *Litopenaeus vannamei* were found in the safety assays. Hence, *Pseudomonas stutzeri* strain CM-11HN has great potential in bioremediation for wastewater treatment and improving water quality in aquaculture systems.

Keywords: *Pseudomonas*, simultaneous N & P removal, heterotrophic nitrification, aerobic denitrification.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi trồng thủy sản là ngành sản xuất lương thực có tốc độ tăng trưởng nhanh, với sản lượng thủy sản toàn cầu đạt 130,9 triệu tấn vào năm 2022, tăng 7,6% so với năm 2020. Trong đó, sản lượng nuôi trồng thủy sản trên đất liền đạt

59,1 triệu tấn, chiếm 62,6% sản lượng toàn cầu [8]. Đây được coi là cột mốc quan trọng đánh dấu sự phát triển của ngành nuôi trồng thủy sản vượt mặt ngành khai thác thủy sản để trở thành ngành sản xuất chính. Tuy nhiên, diện tích và mức độ thâm canh hóa các mô hình nuôi trồng

thủy sản ngày càng mở rộng đã trực tiếp gây ra các tác động xấu đến môi trường [7]. Nước thải và chất thải rắn là một trong số các thách thức lớn ở các mô hình nuôi, đe dọa đến các hệ sinh thái xung quanh và là tác nhân gây ô nhiễm môi trường. Theo một báo cáo trước đây, hàm lượng dinh dưỡng trong các ao nuôi tôm biển (*Penaeus monodon* và *Penaeus vannamei*) ở quy mô bán thâm canh và thâm canh có nguồn gốc chủ yếu từ thức ăn công nghiệp, chiếm khoảng 75-82% nitơ (N), 55-75% phospho (P) và 77-85% carbon (C). Nhưng chỉ 26-35% dinh dưỡng đầu vào chuyển hóa thành sinh khối tôm nuôi [5]. Hơn nữa, nitơ hữu cơ trong phân và thức ăn thừa cũng sẽ chuyển hóa thành amonia (NH_3), nitrit (NO_2^-) và nitrat (NO_3^-) thông qua các quá trình trao đổi chất của vi sinh vật trong thủy vực. Trong đó, amonia và nitrite là các chất có độc tính cao, gây chết động vật thủy sản và cần được loại bỏ khỏi hệ thống nuôi một cách hiệu quả. Đồng thời, phospho cũng phóng thích vào môi trường nước từ các nguồn chất thải hữu cơ trong ao ở dạng phosphate (PO_4^{3-}), tuy không phải là dạng gây độc nhưng tích lũy cùng với nitơ vô cơ trong nước quá cao sẽ dẫn tới tình trạng phú dưỡng, tạo điều kiện cho tảo nở hoa gây mất cân bằng hệ sinh thái và suy giảm chất lượng môi trường nước [3, 10].

Nhiều giải pháp đã được thực hiện nhằm giảm ô nhiễm môi trường trong ao nuôi, tuy nhiên việc sử dụng vi sinh vật hữu ích (Probiotic) trở nên phổ biến vì tính an toàn, hiệu quả và bền vững. Nhóm vi sinh vật này có khả năng loại bỏ các hợp chất gây ô nhiễm hữu cơ hoặc vô cơ, hoặc chuyển hóa chúng sang dạng không ô nhiễm, từ đó cải thiện chất lượng môi trường nước [14]. Quá trình chuyển hóa nitơ trong ao nuôi đòi hỏi hoạt động phối hợp của các nhóm vi sinh vật khác nhau, đặc biệt là vi khuẩn nitrate hóa và vi khuẩn khử nitrate [17]. Trước đây, giải pháp xử lý đạm thông qua quá trình nitrat hóa thường tập trung vào nhóm vi sinh vật tự dưỡng như nhóm vi khuẩn chuyển hóa amonia (ammonia oxidizing bacteria) và nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite (nitrite oxidizing bacteria), tuy nhiên các nhóm vi sinh vật này có tốc độ phát triển chậm và

đễ nhạy cảm với sự thay đổi của môi trường. Đồng thời, giải pháp khử đạm nitơ bởi nhóm sinh vật dị dưỡng (heterotrophic denitrifiers) thường diễn ra ở điều kiện kỵ khí [28]. Ngược lại, ứng dụng probiotic để kiểm soát phospho trong nước ao nuôi chưa được quan tâm, thay vào đó phospho được xử lý bằng các loài thực vật thủy sinh (phytoremediation) như vi tảo và rong biển nhằm hấp thụ và chuyển hóa thành sinh khối thông qua quá trình quang hợp, tuy nhiên giải pháp yêu cầu diện tích lớn, tốc độ xử lý chậm và chịu ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường như cường độ ánh sáng và độ đục của nước [3; 20]. Trong bối cảnh biến đổi khí hậu và mức độ thâm canh hóa hiện nay của ngành thủy sản, các giải pháp xử lý chất thải và quản lý môi trường ao nuôi không chỉ đòi hỏi mang tính an toàn, thích ứng cao mà còn phải diễn ra nhanh và hiệu quả hơn. Các báo cáo gần đây cho thấy, dòng *Pseudomonas* sp. tham gia tích cực vào chu trình nitơ thông qua khả năng khử nitơ có trong thức ăn thừa hoặc phân giúp giảm đáng kể hàm lượng nitrat, amonium gây ô nhiễm nguồn nước, cải thiện chất lượng nước ao nuôi [6, 31]. Hơn nữa, nhóm vi sinh vật này còn có tiềm năng xử lý đồng thời nitơ và phospho hòa tan trong nước thông qua quá trình nitrat hóa dị dưỡng và khử nitrat trong điều kiện hiếu khí (heterotrophic nitrification-aerobic denitrification), từ đó ngăn chặn được các tác động xấu đến môi trường xung quanh [18, 32]. Việc sử dụng nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* sp. trong quản lý môi trường ao nuôi ở Việt Nam vẫn còn nhiều mặt hạn chế, điều này có thể là do sự phổ biến của một số dòng lợi khuẩn khác như *Bacillus* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Rhodobacter* sp., cũng như các đặc tính có lợi đối với môi trường và mức độ an toàn của dòng *Pseudomonas* sp. khi ứng dụng vào thực tiễn cũng chưa được đánh giá. Do đó, nghiên cứu và tuyển chọn các dòng *Pseudomonas* sp. bản địa có khả năng xử lý đồng thời nitơ và phospho là cần thiết, không chỉ cung cấp thêm giải pháp ngăn sự suy giảm chất lượng môi trường nước, mà còn thúc đẩy và tăng cường sự phát triển bền vững của ngành nuôi trồng thủy sản.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phương pháp thu mẫu

26 mẫu nước và mẫu bùn đáy được thu ở các ao tôm quảng canh và quảng canh cải tiến thuộc 3 tỉnh Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau. Khoảng 100 g mẫu bùn được thu ở bề mặt đáy mỗi ao với độ dày khoảng 5 cm bằng bộ dụng cụ lấy lõi đất [27] và 1000 mL nước được thu cách bề mặt nước 50 cm. Sau đó, mẫu tại mỗi ao được bảo quản ở 4°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 3-5 giờ để tiến hành xử lý và phân lập mẫu. Các thông tin về mẫu như thời gian, địa điểm thu mẫu được ghi đầy đủ trên nhãn dán chai thu mẫu.

2. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa nitơ

Mẫu nước và mẫu bùn được đồng nhất trong dung dịch nước muối sinh lý tiệt trùng (0,9% NaCl) trước khi thực hiện các bước phân lập trên môi trường ADM1 [18]. Cụ thể, hút 10mL mẫu đồng nhất vào bình tam giác 250 mL chứa 90 mL môi trường Luria Bertani (LB, thành phần gồm peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L và NaCl 10 g/L), ủ lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở 30°C để gia tăng mật độ vi

khuẩn trước khi phân lập trong 48 giờ. Sau đó, chuyển 10 mL dung dịch nuôi cấy sang bình tam giác chứa 90 mL môi trường ADM1 tiệt trùng và nuôi ở cùng điều kiện. Sau 2 ngày, dung dịch nuôi cấy tiếp tục được chuyển sang môi trường ADM1 mới và quá trình này lặp lại 3 lần cho đến khi nitrate trong môi trường được loại bỏ khoảng 90% [18]. Tiếp theo, pha loãng mẫu với nước muối tiệt trùng (0,9% NaCl) để đạt các độ pha loãng tương ứng 10^{-2} - 10^{-5} trước khi trải lên môi trường thạch BTB và ủ ở 30°C cho đến khi có sự hiện diện của các khuẩn lạc làm biến đổi màu môi trường từ xanh lá sang xanh dương. Các khuẩn lạc đơn sẽ được chọn và cấy rìa nhiều lần trên môi trường LB bổ sung 1,5% agar để thu khuẩn lạc thuần sử dụng cho đánh giá khả năng xử lý nitơ ở dạng nitrate trong môi trường ADM1 bằng phương pháp chuẩn của APHA [1]. Chúng phân lập có khả năng xử lý nitrate mạnh nhất sẽ được chọn để nhận diện các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và khả năng đồng xử lý nitơ và phospho. Các chủng phân lập sẽ được nuôi trong môi trường LB và bảo quản ở -80°C với 20% glycerol cho các thí nghiệm sau.

Bảng 1. Thành phần môi trường khoáng sử dụng trong thí nghiệm

Môi trường	Thành phần của môi trường (g/L)								BB*	Vi lượng**
	CH ₃ COONa	NH ₄ Cl	KNO ₃	NaNO ₂	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	NaCl	Agar		
BTB	1,3	-	0,722	-	0,0877	0,2	15	15	1 mL	2 mL
HNM	1,3	0,382	-	-	0,0877	0,2	15	-		2 mL
ADM1	1,3	-	0,722	-	0,0877	0,2	15	-		2 mL
ADM2	1,3	-	-	0,493	0,0877	0,2	15	-		2 mL
SNDM	1,3	0,127	0,241	0,167	0,0877	0,2	15	-		2 mL

* Dung dịch BB gồm 1% Bromothymol blue trong Absolute Ethanol.

**Dung dịch khoáng vi lượng gồm (g/L): EDTA 10 g/L; ZnSO₄ 0,2 g/L; MnCl₂·4H₂O 1,2 g/L; FeSO₄·7H₂O 1,0 g/L; CuSO₄·5H₂O 0,5 g/L; CoCl₂·6H₂O 0,3 g/L; Na₂MoO₄·2H₂O 0,2 g/L và CaCl₂ 0,1 g/L [18].

3. Đặc điểm nhận diện và định danh chủng phân lập

Các đặc điểm của vi khuẩn như hình thái khuẩn lạc trên môi trường thạch, nhuộm gram, bào tử, tính di động, phản ứng catalase, oxidase

được xác định dựa theo cảm nang phân tích Benson [4]. Bên cạnh đó, môi trường LB điều chỉnh pH (3, 5, 7, 9, 11) và độ mặn (0, 1, 3, 4%) ở các giá trị khác nhau được sử dụng để đánh giá khả năng phát triển của vi khuẩn phân lập. Sau đó, chủng vi khuẩn phân lập được gửi đến Công Ty TNHH Dịch Vụ Và Thương Mại Nam Khoa (TP Hồ Chí Minh) để tiến hành ly trích và giải trình tự gen 16S rRNA bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả giải trình tự được so sánh bằng công cụ BLAST search trên ngân hàng gen của NCBI để định danh loài vi

khuẩn. Các đoạn trình tự tương đồng cao được sử dụng để xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm Mega (phiên bản 11) theo phương pháp Neighbor Joining và độ tin cậy của các mối quan hệ phả hệ được tính toán bằng kỹ thuật “bootstrap” với 1000 lần lặp lại.

4. Khả năng xử lý nitơ và phospho của chủng phân lập

Chủng phân lập có tốc độ xử lý nitơ nitrate nhanh nhất sẽ được chọn để nuôi trong bình tam giác chứa 100 mL canh trường LB ở 30°C trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút. Sau 24 giờ, tiến hành ly tâm dung dịch nuôi cấy và rửa 2 lần bằng nước muối sinh lý (0,9%) ở vận tốc 3000 vòng/phút khoảng 15 phút ở 4°C để thu tế bào vi khuẩn và pha loãng để đạt giá trị OD₆₀₀ xấp xỉ 0,5. Các bình tam giác chứa 100 mL môi trường HNM, ADM1, ADM2, và SNDM hấp tiết trùng được bổ sung 1% huyền phù tế bào vi khuẩn sau đó ủ ở 30°C với tốc độ 150 vòng/phút trong 48 giờ để đánh giá khả năng đồng xử lý nitơ và phospho của các chủng phân lập [18]. Mẫu được thu vào các mốc thời gian 0, 6, 12, 24 và 48 giờ để xác định tăng trưởng của vi khuẩn thông qua giá trị mật độ quang OD₆₀₀, sau đó tiến hành ly tâm mẫu ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để thu phần dịch nổi phân tích các thông số N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ và P-PO₄³⁻ bằng các phương pháp chuẩn của APHA [1]. Chủng phân lập sẽ được đánh giá riêng biệt trên từng môi trường với 3 lần lặp lại.

5. Các đặc tính an toàn của chủng phân lập

5.1 Hoạt tính tiêu huyết

Hoạt tính tiêu huyết được kiểm tra trên môi trường Blood Agar (Nam Khoa) với các bước thực hiện như sau: cấy rìa khuẩn lạc thuần của chủng phân lập trên môi trường Blood Agar và ủ ở 30°C trong 48 giờ. Hoạt tính tan huyết được quan sát trên các đĩa môi trường và đánh giá theo các mức độ mô tả bởi [19] như sau: mức độ α (tan huyết nhẹ với vòng xanh lá xung quanh khuẩn lạc), mức độ β (tan huyết mạnh với vòng sáng xung quanh khuẩn lạc) và mức độ γ (không gây tan huyết và không có sự thay đổi trên môi trường).

5.2 Độ an toàn của chủng phân lập trên tôm thẻ chân trắng

Đặc tính an toàn của chủng phân lập trên tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* được kiểm tra bằng hình thức bổ sung trực tiếp vào nước như sau: Tôm với trọng lượng 0,5±0,1 g được thuần ở độ mặn 10‰ và bố trí trong các bể kính (50 cm×45 cm×40 cm) chứa 40 L nước mặn 10‰ với mật độ 10 con/bể. Thí nghiệm gồm hai nghiệm thức: tôm nuôi trong nước mặn (i) không bổ sung khuẩn (Đối chứng) và (ii) bổ sung chủng phân lập để đạt 10⁵ CFU/mL [29]. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Chủng vi khuẩn được chuẩn bị theo mô tả ở trên và điều chỉnh OD₆₀₀ xấp xỉ 0,5 (tương đương 1,2×10⁸ tế bào/mL). Các bể được kết nối với hệ thống thổi khí nhằm duy trì oxy hòa tan trong nước lớn hơn 4 mg/L. Trong quá trình thí nghiệm, tôm được cho ăn 2 lần/ngày bằng thức ăn thức ăn viên công nghiệp (40% Protein thô, 4% béo thô và 5% xơ) với tỉ lệ 8% trọng lượng tôm. Định kỳ mỗi ngày thay 50% nước và bổ sung vi khuẩn tương ứng cho mỗi nghiệm thức. Tôm được theo dõi hằng ngày để kiểm tra tôm chết hoặc dấu hiệu tôm bệnh trong 7 ngày.

6. Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và phân tích ANOVA một nhân tố. Xử lý bằng chương trình Excel phiên bản 2016 và so sánh thống kê các giá trị trung bình giữa các nghiệm thức bằng phần mềm SPSS phiên bản 20.0 ở mức p<0,05 bằng phép thử Tukey. Các thông số sẽ được tính toán hiệu suất xử lý theo công thức sau:

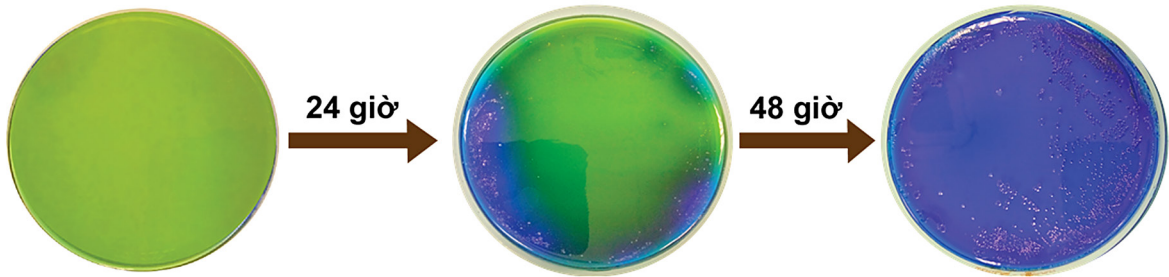
$$\text{Hiệu suất xử lý (\%)} = (C_i - C_f) / C_i \times 100$$

Trong đó C_i là nồng độ ban đầu của các thông số trong mẫu và C_f là nồng độ của các thông số sau thời gian xử lý.

III. KẾT QUẢ

1. Phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitơ

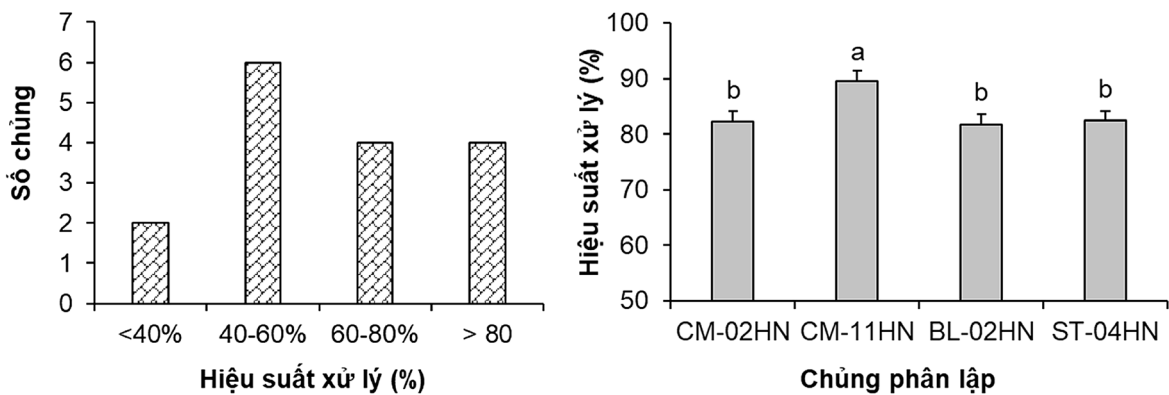
Kết quả phân lập cho thấy 26 chủng phát triển mạnh trên môi trường ADM1 nhưng chỉ 16 chủng biểu hiện khả năng chuyển màu trên môi trường BTB từ xanh lá sang màu xanh dương, biểu thị khả năng khử nitrate sau 48 giờ (Hình 1).



Hình 1. Phản ứng chuyển màu của vi khuẩn phân lập trên môi trường BTB

Đồng thời, khi đánh giá hiệu suất xử lý nitơ trong canh trường ADM1 chỉ có 4 chủng làm giảm hơn 80% hàm lượng N-NO_3^- ban đầu ($101 \pm 4,7$ mg/L), bao gồm chủng CM-02HN, CM-11HN, BL-02HN, ST-04HN (Hình 2).

Trong đó, chủng CM-11HN đạt hiệu suất xử lý 89,5%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các chủng còn lại. Do đó chủng CM-11HN được sử dụng trong các nội dung đánh giá tiếp theo.

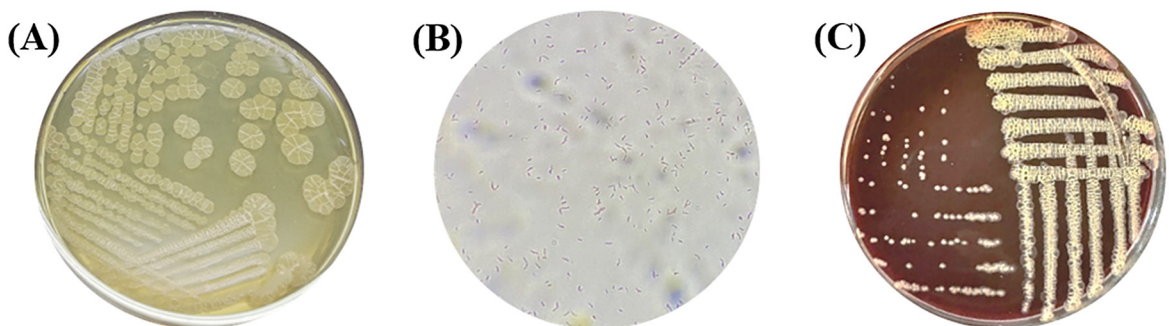


Hình 2. Hiệu suất xử lý nitrate bởi các chủng phân lập

2. Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của chủng CM-11HN

Khuẩn lạc của chủng CM-11HN trên môi trường LB có hình dạng rìa không đều, màu vàng nhạt, mô nổi, đường kính khuẩn lạc khoảng 2,8 mm (Hình 3). Tế bào có dạng hình

que ngắn, gram âm, dương tính với phản ứng catalase và oxidase, có khả năng di động, không sinh bào tử và khả năng khử nitrate mạnh. Hơn nữa, chủng CM-11HN có khả năng phát triển trong môi trường LB ở nồng độ muối lên tới 4% NaCl và chịu được ngưỡng pH từ 7 đến 9.

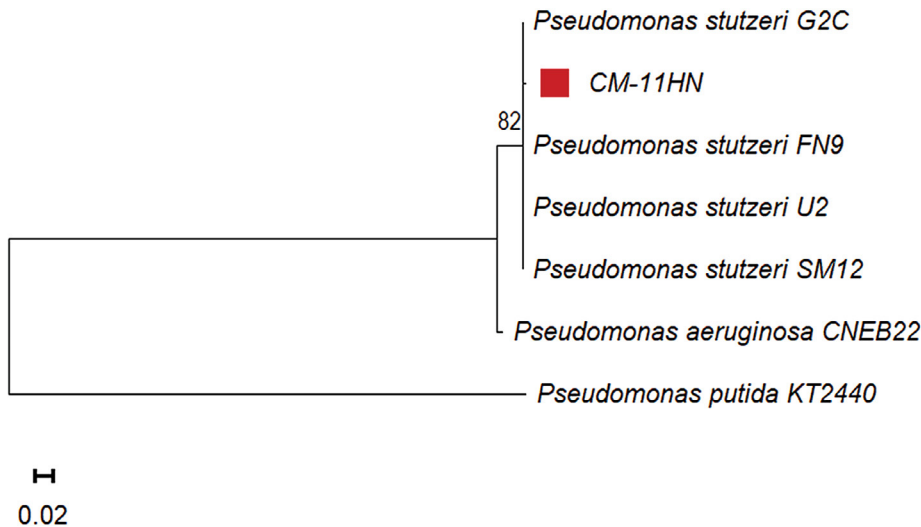


Hình 3. Hình dạng khuẩn lạc (A), tế bào (B) và đặc tính tiêu huyết (C) của chủng CM-11HN

3. Định danh chủng CM-11HN bằng giải trình tự gen 16s rRNA

Kết quả cho thấy các chuỗi trình tự nucleotide của chủng CM-11HN đạt mức tương đồng (99,9%) gần nhất với các mẫu phân lập thuộc loài *Pseudomonas stutzeri*

đã được công bố trên Ngân hàng gen NCBI. Hơn nữa, dựa trên kết quả phân tích phả hệ, chủng CM-11HN nằm cùng nhánh với các loài *Pseudomonas stutzeri* đã được công bố trước đó (Hình 4).

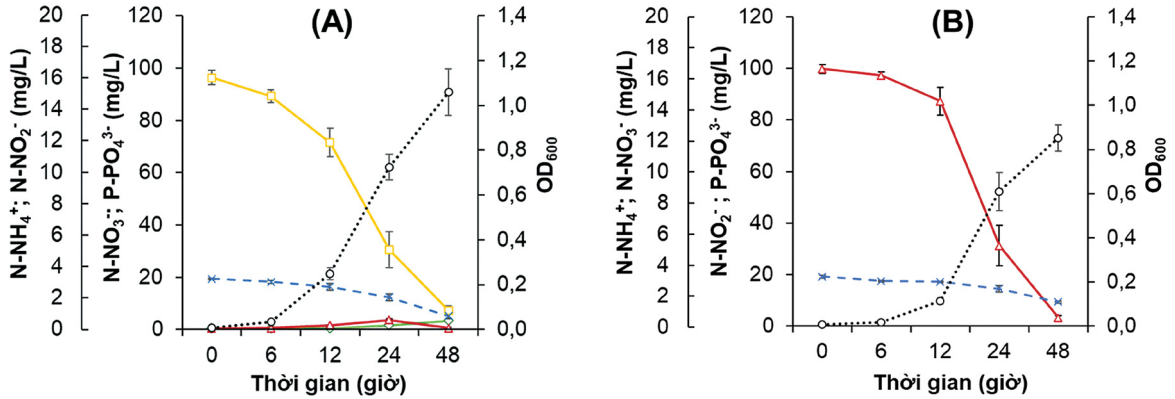


Hình 4. Cây phả hệ dựa trên vùng gen 16S ribosome RNA của chủng CM-11HN và các mẫu vi khuẩn sẵn có trên Ngân hàng gen. Thanh bar trình bày khoảng cách di truyền. Giá trị ở các nốt là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1.000 lần lặp).

4. Hiệu suất xử lý đồng thời nitơ và phospho của chủng CM-11HN

Khả năng khử nitơ trong điều kiện hiếu khí (aerobic denitrifying) bởi chủng CM-11HN được đánh giá trong môi trường khoáng bổ sung N-NO_3^- ($96,4 \pm 2,8$ mg/L) hoặc N-NO_2^- ($99,8 \pm 1,8$ mg/L) là nguồn nitơ duy nhất (Bảng 2 và Hình 5). Kết quả cho thấy, khoảng 92,3% hàm lượng N-NO_3^- và 96,8% hàm lượng N-NO_2^- ban đầu trong môi trường bị loại bỏ sau 48 giờ thí nghiệm, tương ứng với tốc độ khử nitơ lần lượt là $1,855$ mg/L/giờ và $2,013$ mg/L/giờ. Tăng trưởng của vi khuẩn tăng theo thời gian thí nghiệm, đạt giá trị OD trung bình $1,060 \pm 0,103$ và $0,852 \pm 0,061$ tương ứng với N-NO_3^- và N-NO_2^- là nguồn

nitơ. Hơn nữa, khả năng xử lý phospho đồng thời với khử nitơ trong môi trường cũng được ghi nhận. Hàm lượng P-PO_4^{3-} giảm khoảng 72,9% và 51,3% so với hàm lượng ban đầu ($19,4 \pm 0,3$ mg/L và $19,1 \pm 0,5$ mg/L) với nguồn N-NO_3^- và N-NO_2^- , tương ứng tốc độ xử lý khoảng 0,295 và 0,204 mg/L/giờ. Bên cạnh đó, hàm lượng N-NH_4^+ có xu hướng tích lũy với trung bình đạt lần lượt là $0,494 \pm 0,048$ mg/L và $0,644 \pm 0,096$ mg/L với N-NO_3^- hoặc N-NO_2^- sau 48 giờ. Ngược lại, hàm lượng N-NO_2^- tích lũy đạt $0,527 \pm 0,059$ mg/L và giảm $0,039 \pm 0,032$ mg/L sau 48 giờ với đạm KNO_3 . Với NaNO_2 thì hàm lượng N-NO_3^- đạt trung bình $0,455 \pm 0,055$ mg/L sau 24 giờ và giảm trở lại sau 48 giờ.



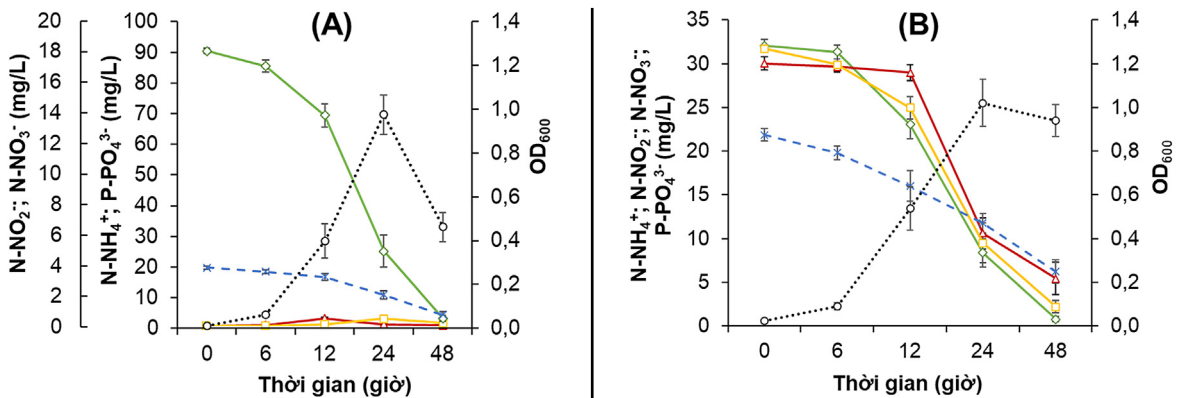
Hình 5. Khả năng xử lý nitơ và phospho bởi chủng CM-11HN khi nuôi trong môi trường với KNO_3 (A) hoặc NaNO_2 (B) là nguồn đạm duy nhất

(—◇— N-NH_4^+ ; —△— N-NO_2^- ; —□— N-NO_3^- ; —×— P-PO_4^{3-} ; ...○... OD_{600})

Dưới điều kiện nitrate hóa có sự hiện diện của oxy (aerobic nitrification), hàm lượng N-NH_4^+ giảm đáng kể từ 90,5 mg/L còn 3,217 mg/L sau 48 giờ, tương đương với hiệu suất xử lý 96,4% và tốc độ xử lý 1,818 mg/L/giờ (Bảng 2 và Hình 6A). Tế bào vi khuẩn nhân đôi đạt pha tăng trưởng trong 24 giờ đầu với giá trị OD trung bình $0,975 \pm 0,091$ và giảm còn $0,462 \pm 0,066$ sau 48 giờ. Hàm lượng P-PO_4^{3-} giảm từ 19,8 mg/L còn 4,355 mg/L với hiệu suất và tốc độ xử lý lần lượt là 78% và 0,321 mg/L/giờ. Hơn nữa, kết quả ghi nhận được hàm lượng N-NO_2^- sau 12 giờ với trung bình $0,47 \pm 0,044$ mg/L, nhưng sau đó giảm mạnh sau 48 giờ. Tương tự, hàm lượng N-NO_3^- có xu hướng tăng, đạt trung bình $0,464 \pm 0,043$ mg/L sau 24 giờ

và giảm trở lại sau 48 giờ.

Bên cạnh đó, chủng CM-11HN có khả năng sử dụng đồng thời cả 3 loại nitơ, trong đó N-NH_4^+ và N-NO_3^- được ưu tiên sử dụng trong 12 giờ với trung bình đạt lần lượt là $23,068 \pm 1,647$ và $24,965 \pm 1,295$ mg/L (Bảng 2 và Hình 6B). Sau 48 giờ hàm lượng N-NH_4^+ , N-NO_3^- và N-NO_2^- giảm còn $0,775 \pm 0,272$; $2,203 \pm 0,682$ và $5,442 \pm 1,854$ mg/L, tương ứng với tốc độ xử lý là 0,652; 0,615 và 0,513 mg/L/giờ. Hàm lượng P-PO_4^{3-} giảm từ 21,9 mg/L còn 6,23 mg/L sau 48 giờ với hiệu suất và tốc độ xử lý lần lượt là 71,5% và 0,326 mg/L/giờ. Giá trị OD đạt trung bình $1,020 \pm 0,108$ sau 24 giờ và $0,939 \pm 0,073$ sau 48 giờ.



Hình 6. Khả năng xử lý nitơ và phospho bởi chủng CM-11HN khi nuôi trong môi trường HNM (A) và SNDM (B)

(—◇— N-NH_4^+ ; —△— N-NO_2^- ; —□— N-NO_3^- ; —×— P-PO_4^{3-} ; ...○... OD_{600})

Bảng 2. Tốc độ xử lý nitơ và phospho bởi chủng CM-11HN khi nuôi ở các nguồn nitơ khác nhau

Môi trường	Nguồn dinh dưỡng	Đầu vào (mg/L)	Đầu ra sau 48 giờ (mg/L)	Tốc độ xử lý N (mgN/L/giờ)	Tốc độ xử lý P (mgP/L/giờ)
HNH	N-NH ₄ ⁺	90,5±0,9	3,217±0,918	1,818±0,019	-
	P-PO ₄ ³⁻	19,8±0,5	4,355±1,087	-	0,321±0,025
ADM1	N-NO ₃ ⁻	96,4±2,8	7,368±1,626	1,855±0,025	-
	P-PO ₄ ³⁻	19,4±0,3	5,243±1,052	-	0,295±0,028
ADM2	N-NO ₂ ⁻	99,8±1,8	3,214±0,814	2,013±0,063	-
	P-PO ₄ ³⁻	19,1±0,5	9,324±0,472	-	0,204±0,01
SNDM	N-NH ₄ ⁺	32,1±0,1	0,775±0,272	0,652±0,01	-
	N-NO ₃ ⁻	30,1±0,7	5,442±1,854	0,513±0,05	-
	N-NO ₂ ⁻	31,7±0,8	2,203±0,682	0,615±0,02	-
	P-PO ₄ ³⁻	21,9±0,4	6,23±1,313	-	0,326±0,02

5. Các đặc tính an toàn của chủng phân lập

Khuẩn lạc chủng CM-11HN sau 48 giờ phát triển trên môi trường thạch máu không làm thay đổi màu môi trường, biểu thị chủng không mang đặc tính tiêu huyết (Hình 3C). Do đó, chủng phân lập được xếp loại mức độ γ (không gây tan huyết) và không mang độc tính sinh haemolysin. Bên cạnh đó, tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* được sử dụng trong đánh giá nhằm kiểm tra khả năng gây độc tính hoặc gây bệnh của vi khuẩn phân lập trên nhóm sinh vật giáp xác. Kết quả cho thấy tôm nuôi trong nước bổ sung chủng CM-11HN đạt tỉ lệ sống 100% và khác biệt không ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Qua hai thử nghiệm trên cho thấy chủng CM-11HN không mang độc lực, cũng như các đặc tính gây hại, biểu thị tính an toàn đối với đời sống của thủy sinh vật và có tiềm năng phát triển probiotic ứng dụng trong xử lý môi trường ao nuôi thủy sản.

IV. THẢO LUẬN

Trước đây, nhiều nghiên cứu đã phân lập và chọn lọc được các chủng có khả năng xử lý đồng thời nitơ và phospho trong trầm tích và nước thải chủ yếu thuộc dòng *Pseudomonas* [15, 18, 32]. Hay trong các hệ thống nuôi tôm *Litopenaeus vannamei* hoặc cá tra *Pangasianodon hypophthalmus*, sự hiện diện của các dòng *Pseudomonas* sp. đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa các

hợp chất vô cơ như đạm ammonium, nitrite và nitrate [6, 31] và được cho là có tiềm năng phát triển probiotic ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản [11, 24]. Trong nghiên cứu hiện tại, 16 chủng phân lập có tiềm năng khử NO₃⁻ được nhận diện thông qua sự thay đổi màu sắc từ xanh lá sang xanh dương trên môi trường BTB, do sự gia tăng pH trong môi trường bởi quá trình khử nitrate [16]. Tuy nhiên, duy nhất chủng CM-11HN đạt hiệu suất xử lý cao nhất (khoảng 90%) sau 48 giờ nuôi cấy trong canh trường ADM1. Theo hệ thống phân loại Bergey thì dòng *Pseudomonas* thường mang các đặc điểm như tế bào que ngắn, gram âm, dương tính với phản ứng catalase và oxidase, tính di động, không sinh bào tử và đặc biệt là khả năng khử nitrate nhanh [23]. Các đặc điểm sinh hóa của chủng CM-11HN trong nghiên cứu hiện tại tương đồng với các đặc điểm mô tả trên. Hơn nữa, kết quả giải trình tự và phân tích phả hệ cho thấy chủng CM-11HN nằm cùng nhánh với loài *Pseudomonas stutzeri*. Trong các báo cáo trước đây, dòng *Pseudomonas stutzeri* thường hiện diện trong các mẫu nước và bùn ao nuôi thủy sản ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long với đặc tính chuyển hóa nitơ nhanh, giúp cải thiện môi trường ao nuôi [6, 24, 31] và cũng là loài vi sinh vật được phép lưu hành trong các sản phẩm xử lý môi trường nuôi trồng thủy sản theo Thông tư số 01/2022/TT-BNNPTNT [2]

Khả năng khử nitơ trong điều kiện hiếu khí (aerobic denitrification) với nguồn đạm N-NO_3^- hoặc N-NO_2^- duy nhất cho thấy chủng CM-11HN đạt hiệu suất xử lý hơn 90% sau 48 giờ, tương ứng với tốc độ khử $1,819 \text{ mgNO}_3^-/\text{L/giờ}$ và $2,012 \text{ mgNO}_2^-/\text{L/giờ}$, thấp hơn so với chủng *Pseudomonas stutzeri* ADP-19 ($3,03 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{L/giờ}$ và $4,96 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L/giờ}$) và chủng *Pseudomonas putida* NP5 ($7,96 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{L/giờ}$ và $8,59 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L/giờ}$) [18, 32]. Trong quá trình khử N-NO_3^- , kết quả ghi nhận sự tích lũy N-NO_2^- trong 24 giờ đầu và giảm trở lại sau đó, đây được coi là sản phẩm trung gian của quá trình khử trong điều kiện hiếu khí ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) [15]. Vào cuối pha tăng trưởng, N-NH_4^+ hiện diện với hàm lượng nhỏ trong cả hai môi trường, điều này được lý giải là do sự phóng thích dinh dưỡng trở lại từ các tế bào vi khuẩn chết. Cùng với đó, hiệu suất xử lý P-PO_4^{3-} bởi chủng CM-11HN đạt cao nhất khoảng $0,295 \text{ mgP/L/giờ}$ và $0,204 \text{ mgP/L/giờ}$ tương ứng với nguồn đạm N-NO_3^- hoặc N-NO_2^- , kết quả này tương đồng với đánh giá trước đây trên chủng *Pseudomonas stutzeri* ADP-19 ($0,359 \text{ mgP/L/giờ}$ và $0,256 \text{ mgP/L/giờ}$), nhưng thấp hơn so với chủng *Pseudomonas putida* NP5 ($1,33 \text{ mgP/L/giờ}$ và $1,54 \text{ mgP/L/giờ}$) [18, 32].

Khi N-NH_4^+ được bổ sung làm nguồn nitơ duy nhất, chủng CM-11HN đạt hiệu suất xử lý 96,4% và tốc độ xử lý là $1,818 \text{ mgNH}_4^+/\text{L/giờ}$, thấp hơn đáng kể so với chủng *Pseudomonas stutzeri* ADP-19 ($3,44 \text{ mgNH}_4^+/\text{L/giờ}$) và chủng *Pseudomonas putida* NP5 ($9,96 \text{ mgNH}_4^+/\text{L/giờ}$) [18, 32]. Đồng thời, hiệu suất xử lý P-PO_4^{3-} cao nhất đạt 78% và tốc độ xử lý là $0,321 \text{ mgP/L/giờ}$, cao hơn so với dòng *Bacillus cereus* GS-5 ($0,2 \text{ mgP/L/giờ}$), tương đồng với *Pseudomonas stutzeri* ADP-19 (73,3%), nhưng thấp hơn so với *Pseudomonas putida* NP5 ($1,55 \text{ mgP/L/giờ}$) [18, 26, 32]. Hơn nữa, sự hiện diện của các sản phẩm trung gian như N-NO_2^- và N-NO_3^- với hàm lượng nhỏ ($<0,5 \text{ mg/L}$) trong môi trường HNM vào đầu và cuối giai đoạn tăng trưởng cho thấy chủng CM-11HN có khả năng thực hiện quá trình nitrate

hóa ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) dưới hình thức dị dưỡng (heterotrophic nitrification) [13]. Sau đó, cả hai sản phẩm đều có xu hướng giảm vào cuối giai đoạn thí nghiệm, điều này có thể là do N-NO_2^- và N-NO_3^- bị khử bởi enzyme nitrite reductase và nitrate reductase tiết ra bởi dòng vi khuẩn thí nghiệm ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), tương đồng với các báo cáo trước đây khi kiểm tra khả năng nitrate hóa dị dưỡng trên các dòng vi khuẩn *Pseudomonas* hoặc *Bacillus* [18, 26]. So với nhóm vi khuẩn tự dưỡng (autotrophic nitrifiers) thì nhóm vi sinh vật dị dưỡng (heterotrophic nitrifiers) được cho là ưu thế hơn khi tham gia vào quá trình nitrate hóa trong thủy vực như khả năng thích ứng với môi trường (nhiệt độ, độ mặn và pH) và tốc độ tăng trưởng nhanh, hiệu suất xử lý đạm cao và sử dụng được nhiều nguồn hợp chất hữu cơ hơn (carbon và nitơ) [28]. Nhìn chung, chủng CM-11HN thể hiện tốc độ xử lý N-NO_2^- sau 48 giờ cao hơn so với N-NH_4^+ và N-NO_3^- khi sử dụng một nguồn nitơ duy nhất. Kết quả tương đồng với ghi nhận trên chủng *Pseudomonas aeruginosa* SNDPR-01 với tốc độ xử lý N-NO_2^- ($14,72 \pm 3,23 \text{ mg/L/giờ}$) cao gấp đôi so với N-NH_4^+ ($6,24 \pm 0,66 \text{ mg/L/giờ}$) và N-NO_3^- ($7,23 \pm 1,50 \text{ mg/L/giờ}$), điều này được lý giải là do sự hiện diện của N-NO_2^- trong cả hai quá trình nitrat hóa và khử nitrat làm chậm hoặc ức chế các hoạt động chuyển hóa bởi vi khuẩn. Nhưng sau khoảng thời gian thích nghi được với nồng độ N-NO_2^- cao thì dòng *Pseudomonas* tiếp tục thực hiện các quá trình chuyển hóa [15].

Ngược lại, khi với nhiều nguồn nitơ được bổ sung vào môi trường, tốc độ xử lý N-NH_4^+ bởi chủng CM-11HN vượt trội hơn so với tốc độ xử lý N-NO_2^- cho thấy chủng lợi khuẩn ưu tiên sử dụng N-NH_4^+ hơn so với N-NO_3^- và N-NO_2^- ($\text{N-NH}_4^+ > \text{N-NO}_3^- > \text{N-NO}_2^-$). Kết quả tương đồng với đánh giá trên chủng *Pseudomonas stutzeri* ADP-19 khi sử dụng nhiều nguồn nitơ khác nhau [18]. Hàm lượng N-NH_4^+ trong môi trường đóng vai trò như một chất cho electron thay thế (an alternative electron donor) trong quá trình khử nitrat, từ đó cải thiện hiệu suất

loại bỏ nitơ [26]. Hơn nữa, N-NH_4^+ còn được sử dụng cho quá trình tổng hợp tế bào thông qua quá trình đồng hóa hơn là tham gia vào quá trình nitrat hóa dị dưỡng, từ đó cải thiện hiệu quả quá trình khử nitrat hiếu khí. Ngoài ra, N-NO_3^- cũng sẽ là nguồn đạm sử dụng tổng hợp tế bào khi N-NH_4^+ cạn kiệt [21, 30]. Quá trình đồng hóa N-NH_4^+ là thiết yếu đối với sự phát triển của vi khuẩn, khả năng hấp thụ và sử dụng các nguồn nitơ vô cơ, trong khi chu trình khử nitrate hiếu khí tập trung chủ yếu vào quá trình xử lý phospho hòa tan và nhu cầu oxy hóa học (COD) [12]. Một báo cáo khác cho rằng N-NO_3^- hoặc N-NO_2^- là chất tiếp nhận electron, đóng vai trò quan trọng đối với quá trình hấp thụ và tích trữ phospho bởi tế bào vi khuẩn [33]. Cùng với đó, khoảng 79,83% hàm lượng P-PO_4^{3-} được cho là đồng hóa thành sinh khối tế bào, phần phospho còn lại được hấp thụ bởi các chất polymer ngoại bào do vi khuẩn tiết ra [26]. Do đó, nitơ và phospho trong môi trường được loại bỏ chủ yếu bởi quá trình đồng hóa. Dựa vào các kết quả và đánh giá so sánh cho thấy chủng CM-11HN có khả năng loại bỏ đồng thời được nitơ và phospho hòa tan trong môi trường thông qua các con đường chuyển hóa HNAD (heterotrophic nitrification and aerobic denitrification) và quá trình đồng hóa (assimilation) của vi khuẩn, một đặc tính thường gặp trên các dòng *Pseudomonas* sp. [13, 28].

Bên cạnh đó, chủng CM-11HN được xác định các yếu tố độc lực thông qua hoạt tính tiêu huyết và đánh giá trực tiếp đến sự sống của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*. Hoạt tính tiêu huyết hay hemolysin là một trong những tiêu chí quan trọng trong sàng lọc probiotic, do mang độc lực có khả năng gây ra hiện tượng thiếu máu và phù nề ở vật chủ, do đó chỉ các dòng vi khuẩn không mang đặc tính tiêu huyết mới phù hợp phát triển probiotic [22]. Kết quả cho thấy chủng CM-11HN không biểu hiện các đặc tính gây tiêu huyết, cũng như không gây chết tôm khi bổ sung trực tiếp vào nước nuôi tôm. Tôm cũng không biểu hiện bất kỳ triệu chứng của bệnh khi quan sát

các bộ phận của tôm (gan tụy, ruột, màu sắc, phụ bộ) dựa theo các biểu hiện của tôm khỏe [25]. Qua các đặc tính trên, chủng CM-11HN được xem là đối tượng tiềm năng để phát triển probiotic ứng dụng trong xử lý các hợp chất dinh dưỡng hòa tan (nitơ và phospho) trong môi trường ao nuôi thủy sản, từ đó giảm thiểu các tác động gây ô nhiễm đến môi trường xung quanh. Tuy nhiên, cần nghiên cứu đầy đủ hệ gen của chủng phân lập để đánh giá hoàn chỉnh con đường chuyển hóa HNAD thông qua các gen đảm nhiệm chức năng nitrate hóa (*amoA*, *hao*), khử nitơ hiếu khí (*napA*, *nirS*, *cnorB* và *nosZ*), tích lũy phosphate (*ppk*) và thủy phân polyphosphate (*ppx*) [15]. Hơn nữa, do tính ưu thế và cạnh tranh bởi hệ vi sinh bản địa nên khả năng thích nghi và sống sót của các dòng lợi khuẩn bổ sung vào môi trường cần được theo dõi bằng các giải pháp công nghệ, đặc biệt là công nghệ giải trình tự thế hệ mới (Next-generation sequencing, NGS) để đánh giá sự hiện diện của chủng lợi khuẩn cùng với các chức năng và con đường chuyển hóa trong thủy vực [9].

V. KẾT LUẬN

Tổng cộng 16 chủng phân lập có khả năng khử nitrate thông qua sự thay đổi màu trên môi trường BTB. Tuy nhiên, chỉ 4 chủng đạt hiệu suất xử lý hơn 80% hàm lượng N-NO_3^- trong môi trường ADM-1, trong đó chủng CM-11HN đạt hiệu suất xử lý cao nhất. Kết quả giải trình tự cho thấy chủng CM-11HN tương đồng với loài *Pseudomonas stutzeri* và biểu hiện khả năng xử lý đồng thời nitơ và phospho trong các môi trường với nguồn nitơ khác nhau thông qua con đường chuyển hóa HNAD. Trong số các nguồn nitơ, N-NH_4^+ được chủng phân lập ưu tiên sử dụng và hấp thụ cho quá trình sinh trưởng của tế bào so với N-NO_3^- và N-NO_2^- . Hơn nữa, chủng CM-11HN không mang hoạt tính tiêu huyết và thể hiện tính an toàn khi bổ sung trực tiếp vào nước nuôi tôm. Do đó, chủng CM-11HN có tiềm năng ứng dụng như một giải pháp sinh học hữu ích trong cải thiện chất lượng môi trường nước ao nuôi thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. APHA (2017), *Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd Edition*, American public health association, American water works association, water environment federation, Denver. 1504 pp.
2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2024), Bảng mã số HS đối với danh mục hóa chất, chế phẩm sinh học, vi sinh vật, nguyên liệu sản xuất thức ăn được phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản tại Việt Nam và thức ăn thủy sản, sản phẩm xử lý môi trường nuôi trồng thủy sản thành phẩm. Trong *Thông tư số 01/2024/TT-BNNPTNT về Ban hành bảng mã số HS đối với danh mục hàng hóa thuộc thẩm quyền quản lý nhà nước của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn và danh mục hàng hóa xuất, nhập khẩu phải kiểm tra chuyên ngành trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn* (Mục 16).
3. Boyd C.E. (2020), *Water Quality: An Introduction, 3rd Edition*, Springer, Berlin.
4. Brown A.E., and Smith H.R. (2017), *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual, Concise Version, 14th Edition*, McGraw-Hill Education, 2 Penn Plaza, New York.
5. Dien L.D., Hiep L.H., Hao N.V., Sammut J., and Burford M.A. (2018), "Comparing nutrient budgets in integrated rice-shrimp ponds and shrimp grow-out ponds", *Aquaculture*, 484, 250–258.
6. Diep C.N., Cam P.M., Vung N.H., Lai T.T., and My N.T.X. (2009), "Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment", *Bioresource Technology*, 100(16), 3787–3791.
7. Edwards P. (2015), "Aquaculture environment interactions: past, present and likely future trends", *Aquaculture*, 447, 2–14.
8. FAO (2024), *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
9. Garner E., Davis B.C., Milligan E., Blair M.F., Keenum I., Maile-Moskowitz A., Pan J., Gnegy M., Liguori K., Gupta S., Prussin A.J., Marr L.C., Heath L.S., Vikesland P.J., Zhang L., and Pruden A. (2021), "Next generation sequencing approaches to evaluate water and wastewater quality", *Water research*, 194, 116907.
10. Herath S.S., and Satoh S. (2015), Chapter 15 - Environmental impact of phosphorus and nitrogen from aquaculture, In *Feed and Feeding Practices in Aquaculture* (pp. 369–386), Woodhead Publishing.
11. Hoque F., Jawahar A.T., Nagesh T.S., and Kamilya D. (2019), "*Pseudomonas aeruginosa* FARP72 offers protection against *Aeromonas hydrophila* infection in *Labeo rohita*", *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 973–980.
12. Hou P., Sun X., Fang Z., Feng Y., Guo Y., Wang Q., and Chen C. (2021), "Simultaneous removal of phosphorous and nitrogen by ammonium assimilation and aerobic denitrification of novel phosphate-accumulating organism *Pseudomonas chloritidis* mutants K14", *Bioresource technology*, 340, 125621.
13. Hu B., Lu J.Y., Qin Y.X., Zhou M., Tan Y., Wu P., and Zhao J.Q. (2023), "A critical review of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification process: Influencing factors and mechanisms", *Journal of Water Process Engineering*, 54, 103995.
14. Hu M., Wang X., Wen X., and Xia Y. (2012), "Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis", *Bioresource Technology*, 117, 72–79.
15. Huang M.Q., Cui Y.W., Huang J.L., Sun F.L., and Chen S. (2022), "A novel *Pseudomonas aeruginosa* strain performs simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and aerobic phosphate removal", *Water research*, 221, 118823.
16. Ji B., Yang K., Zhu L., Jiang Y., Wang H., Zhou J., and Zhang H. (2015), "Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(4), 643–651.
17. Lee H.W., Lee S.Y., Lee J.W., Park J.B., Choi E.S., and Park Y.K. (2002), "Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge", *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 85–94.
18. Li B., Jing F., Wu D., Xiao B., and Hu Z. (2021), "Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus by a novel aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacterium, *Pseudomonas stutzeri* ADP-19",

- Bioresource Technology*, 321, 124445.
19. Luis-Villaseñor I.E., Macías-Rodríguez M.E., Gómez-Gil B., Ascencio-Valle F., and Campa-Córdova, Á. I. (2011), “Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*”, *Aquaculture*, 321, 136–144.
 20. Luo G. (2022), “Review of waste phosphorus from aquaculture: Source, removal and recovery”, *Reviews in Aquaculture*, 15(3), 1058–1082.
 21. Muro-Pastor M.I., Reyes J.C., and Florencio F.J. (2005), “Ammonium assimilation in cyanobacteria”, *Photosynthesis Research*, 83(2), 135–150.
 22. Ouwehand A., Vankerckhoven V., Goossens H., Huys G., Swings J., Vancanneyt M., and Läähteenmäki A. (2005), *The safety of probiotics in foods in Europe and its legislation. Probiotics in food safety and human health*, CRC Press, Boca Raton, pp 405–429
 23. Palleroni N.J. (2015), *Pseudomonas* †, In *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>
 24. Phan T.T.C., Vu U.N., Pham N.T.T., Vu H.H., and Huynh G.T. (2022), “Evaluation of *Pseudomonas stutzeri* AM1 and *Pseudomonas oleovorans* ST1.1 isolated from shrimp pond sediments as probiotics for whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* culture”, *International Journal of Aquatic Biology*, 10(3), 201–208.
 25. Prangnell D.I., and Samocha T.M. (2019), Chapter 12: Disease and Biosecurity, In *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp* (pp. 219-241), Academic Press, Elsevier Inc.
 26. Rout P.R., Bhunia P., and 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.
 27. Somsiri T., Chinabu S., Phuong N. T., and Oanh D.T.H. (2006), “A simple device for sampling pond sediment”, *Aquaculture*, 258, 650-654.
 28. Song T., Zhang X., Li J., Wu X., Feng H., and Dong W. (2021), “A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs)”, *The Science of the Total Environment*, 801, 149319.
 29. Su Z., Li Y., Pan L., and Xue F. (2016), “An investigation on the immunoassays of an ammonia nitrogen-degrading bacterial strain in aquatic water”, *Aquaculture*, 450, 17–22.
 30. Sun Y., Feng L., Li A., Zhang X., Yang J., and Ma F. (2017), “Ammonium assimilation: An important accessory during aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13”, *Bioresource Technology*, 234, 264–272.
 31. Tran T.T.T., Bott N.J., Dai L.N., Trung N.N., Hoang T.D.O., Le H.D., Le T.L., and Chu H.H. (2019), “The Role of *Pseudomonas* in Heterotrophic Nitrification: A Case Study on Shrimp Ponds (*Litopenaeus vannamei*) in Soc Trang Province”, *Microorganisms*, 7(6), 155-158.
 32. Yang L., Wang X.-H., Cui S., Ren Y.-X., Yu J., Chen N., Xiao Q., Guo L.-K., and Wang R.-H. (2019), “Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5”, *Bioresource Technology*, 285, 121360.
 33. Zhang Y., Xu Z., Li J., Liu D., Yuan Y., Chen Z., and Wang G. (2019), “Cooperation between two strains of *Enterobacter* and *Klebsiella* in the simultaneous nitrogen removal and phosphate accumulation processes”, *Bioresource Technology*, 291, 121854.