

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.094

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CHUYỂN HÓA ĐẠM TỪ Bùn ĐÁY AO NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Phạm Thị Tuyết Ngân\*, Vũ Hùng Hải, Huỳnh Trường Giang và Vũ Ngọc Út

Bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Phạm Thị Tuyết Ngân (email: pttngan@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 22/03/2020

Ngày nhận bài sửa: 04/06/2020

Ngày duyệt đăng: 28/08/2020

### Title:

Isolation and selection of nitrifying bacteria from sediment samples in intensive whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ponds

### Từ khóa:

Oxy hóa ammonia, oxy hóa nitrite, vi khuẩn chuyển hóa đạm

### Keywords:

Ammonia oxidation, nitrifying bacteria, nitrite oxidation

### ABSTRACT

The study was conducted to isolate and to select nitrifying bacteria from sediment samples of whiteleg shrimp culture ponds. In this study, 121 nitrifying bacterial strains have been successfully isolated. As a result, the most common isolates were short rods, Gram-negative and motile. Among the obtained strains, TB7.2 showed the highest ammonia oxidation efficiency (39,02%) while strain TV4.2 performed the highest nitrite oxidation efficiency (27,8%) after 5 days of incubation. Strain TB7.2 and TV4.2 are Gram-negative, rod bacteria and have high potential for water treatment in aquaculture.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa đạm từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ chân trắng được thực hiện nhằm bổ sung vào bộ sưu tập vi khuẩn hữu ích phục vụ nuôi trồng thủy sản. Trong nghiên cứu này, 121 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa đạm đã được phân lập, chúng có nguồn gốc từ mẫu bùn trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng. Đa số các chủng vi khuẩn này có dạng que ngắn, Gram âm và chuyển động. Trong số đó, chủng TB7.2 có khả năng oxy hóa ammonia tốt nhất đạt 39,02%, và chủng TV4.2 có hiệu suất oxy hóa nitrite đạt đến 27,8% sau 5 ngày. Chủng TB7.2 và TV4.2 có đặc điểm là trực khuẩn Gram âm, có tiềm năng ứng dụng xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản.

Trích dẫn: Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Huỳnh Trường Giang và Vũ Ngọc Út, 2020. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa đạm từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(4B): 154-160.

## 1 GIỚI THIỆU

Những năm qua, nghề nuôi tôm ở nước ta phát triển rất mạnh không những về qui mô mà còn ở sự đa dạng hóa các mô hình nuôi. Trong năm 2019, diện tích nuôi là 720.000 ha, đạt sản lượng 750.000 tấn trong đó tôm sú là 270.000 tấn, tôm thẻ chân trắng là 480.000 tấn với các mô hình nuôi khác nhau. Khi diện tích nuôi ngày càng mở rộng thì người nuôi gặp phải nhiều trở ngại mới, đó là ô nhiễm môi trường và dịch bệnh bởi lượng thức ăn dư thừa, lượng chất thải từ tôm,... tích tụ xuống đáy ao lâu ngày gây ô nhiễm, trong đó các hợp chất chứa nito

như  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  với hàm lượng cao có thể gây độc cho tôm, cá. Ở Đồng bằng sông Cửu Long, diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng là 75.994 ha với tổng sản lượng đạt 305.774 tấn (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2017). Hàm lượng ammonia ở mức 0,425 mg/L trong môi trường nước có thể gây độc cho cá và các động vật thủy sinh khác (Siripong and Rittmann, 2007). Ammonia gây độc trực tiếp đến hệ hô hấp của cá và tôm, gây mất cân bằng về mặt lý sinh, giảm sức đề kháng và dẫn đến tôm cá bị chết. Hàm lượng nitrite vượt quá 0,3 mg/L sẽ ức chế sự vận chuyển oxy trong máu, gây độc rất lớn cho vật

nuôi. Nitrate là sản phẩm tiếp theo của quá trình oxy hóa nitrite, với hàm lượng vượt quá 10 mg/L gây nên sự phú dưỡng, ảnh hưởng lớn đến môi trường thủy sản (Boyd, 1989). Do đó, việc tìm ra giải pháp xử lý môi trường ao nuôi thủy sản hiện nay là rất cần thiết. Theo Đặng Đình Kim và *ctv.* (2006), khi bổ sung chế phẩm sinh học vào ao nuôi, các chỉ tiêu lý, hóa, sinh được cải thiện rõ. Vì vậy, xu hướng sử dụng các vi sinh vật hữu ích cho ao nuôi thủy sản càng tăng. Hiện nay, rất nhiều chế phẩm sinh học đã xuất hiện trên thị trường với thành phần chủ yếu là các dòng vi khuẩn thuộc các chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, ... các dòng này có khả năng phân giải protein thành các polypeptide, amino acid,  $\text{NH}_3$  (Tăng Thị Chính và Đặng Đình Kim, 2007). Tuy nhiên, chất lượng các chế phẩm sinh học chưa ổn định nên chưa đủ sức đáp ứng nhu cầu sử dụng của ngành tôm. Để góp phần trong công tác nghiên cứu và sản xuất các chế phẩm sinh học ứng dụng trong thủy sản bằng cách tìm ra những dòng vi khuẩn bản địa và để tiến tới một nền thủy sản bền vững, giảm ô nhiễm môi trường, giảm chi phí sản xuất và tăng thu nhập cho người nuôi, đề tài “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyên hóa đạm từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)” được thực hiện.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Địa điểm thu mẫu bùn

Địa điểm thu mẫu tại 2 tỉnh là Cà Mau (huyện Cái Nước, Ngọc Hiển và Thới Bình) và Trà Vinh (Huyện Duyên Hải). Phương pháp thu mẫu nền đáy bằng hệ thống ống PVC đã được tiệt trùng bằng dung dịch cồn 70% dựa theo Somsiri *et al.* (2006). Tại mỗi ao, mẫu bùn được thu ở 3 vị trí: đầu ao, giữa ao và cuối ao theo một đường chéo. Ở mỗi vị trí thu khoảng 100 g bùn. Mẫu được giữ lạnh bằng nước đá và chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 3 - 5 giờ, sau đó mẫu được bảo quản ở 4°C và xử lý trong vòng 2 giờ. Các thông tin như tên ao, ngày tháng và thời gian thu mẫu được ghi đầy đủ trên nhãn và dán trên chai thu mẫu.

### 2.2 Phương pháp phân lập và nuôi tăng sinh vi khuẩn

Phương pháp phân lập và nuôi tăng sinh vi khuẩn từ mẫu bùn được mô tả bởi Chankaew *et al.* (2017), gồm các bước như sau: cho 1g mẫu bùn vào 20 mL môi trường AOB (bổ sung 1% NaCl) gồm 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 13,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,01 g  $\text{FeCl}_3$ ; 0,18 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và 1.000 mL nước cất (Spieck and Bock, 2005). Môi trường được chuẩn bị trong bình

100 mL và nuôi ở 28°C trên máy lắc với vận tốc 160 rpm (vòng/phút) trong điều kiện che tối để nuôi tăng sinh mật độ vi khuẩn oxy hóa đạm ammonium trước khi phân lập. Sau 7 ngày nuôi, tiến hành pha loãng mẫu và phân lập vi khuẩn trên môi trường AOB (bổ sung 1% NaCl và 1,5% Agar), ở 28°C trong 7 ngày, chọn khuẩn lạc đơn có hình dạng và màu sắc khác nhau để tách ròng đến khi đạt được khuẩn lạc đơn và đồng nhất về mặt hình thái. Sau đó, các khuẩn lạc thuần được nuôi tăng sinh trong môi trường AOB lỏng ở 28°C, lắc 160 rpm trong 7 ngày để tiến hành nghiên cứu sàng lọc. Thực hiện tương tự với vi khuẩn oxy hóa nitrite trên môi trường NOB gồm các thành phần khoáng cơ bản như trên môi trường AOB được thay thế  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  thành  $\text{NaNO}_2$  (Spieck and Bock, 2005).

### 2.3 Phương pháp xác định hình dạng, đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

Hình dạng kích thước và tính ròng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow and Feltham, 1993).

**Phản ứng Catalase:** dùng que cấy vô trùng lấy một ít khuẩn lạc phết lên lam kính, sau đó nhỏ một giọt dung dịch  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%) lên lam. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính với Catalase sẽ có hiện tượng sủi bọt khí và ngược lại.

**Phản ứng oxidase:** phết một ít vi khuẩn lên đĩa giấy đã tẩm dung dịch tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) bằng que cấy vô trùng. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính sẽ làm giấy chuyển sang màu đen và ngược lại.

**Tính di động:** nhỏ một giọt nước cất lên lam kính, dùng que cấy vô trùng trải đều vi khuẩn lên lam, đặt bằng lamên và quan sát bằng kính hiển vi vật kính 40X. Tính di động được xác định dựa theo cầm nang của (Barrow and Feltham, 1993).

**Xác định khả năng sinh bào tử:** dung dịch huyền phù chứa vi khuẩn trước khi cấy trên môi trường chuyên biệt AOB và NOB (bổ sung 1,5% agar) được xử lý nhiệt ở 80°C trong 30 phút. Sau khi ủ ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ, nếu vi khuẩn phát triển thì vi khuẩn có khả năng sinh bào tử và ngược lại.

### 2.4 Phương pháp sàng lọc các chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm

Các chủng vi khuẩn phân lập được sàng lọc bằng phương pháp phản ứng màu với thuốc thử Griess-Ilosvay (Yang *et al.*, 2011). Cụ thể, nhỏ 1 giọt thuốc thử vào ống nghiệm chứa 5 mL huyền phù vi khuẩn oxy hóa ammonia nuôi sau 7 ngày. Những ống dương tính cho phản ứng có màu hồng được xác

định nồng độ TAN bằng phương pháp chuẩn (APHA *et al.*, 2005) để đánh giá hiệu quả chuyển hóa đạm và trữ lạnh ở -80°C với 25% glycerol cho các nghiên cứu sau. TAN là tổng nồng độ NH<sub>3</sub> và NH<sub>4</sub><sup>+</sup> trong nước được thu và trữ lạnh ở 4°C trước khi phân tích bằng so màu quang phổ theo phương pháp Phenate (APHA *et al.*, 2005). Tiến hành tương tự đối với vi khuẩn oxy hóa nitrite, tuy nhiên chọn những ống âm tính với thuốc thử cho phản ứng không màu hoặc màu nhạt nhất và xác định nồng độ NO<sub>2</sub><sup>-</sup> bằng phương pháp Sulphanilamide (APHA *et al.*, 2005).

**2.5 Đánh giá khả năng chuyển hóa đạm của các chủng vi khuẩn tuyển chọn**

Chọn 5 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa mạnh nhất để đánh giá khả năng chuyển hóa đạm theo phương pháp Chankaew *et al.* (2017) với một vài sự thay đổi: các chủng chuyển hóa đạm ammonia tiềm năng được nuôi tăng sinh và ly tâm với vận tốc 5000 rpm trong 10 phút để thu sinh khối tế bào, rửa lại 2 lần bằng dung dịch muối sinh lý (0,85% NaCl). Sau đó, 1 mL dịch sinh khối tế bào (10<sup>6</sup> CFU/mL) đã được điều chỉnh mật độ quang OD<sub>600 nm</sub> cho vào ống nghiệm 10 mL môi trường chuyên biệt AOB đã điều chỉnh nồng độ N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>mg/L 100 mg/L (kết quả ngày 0 đo được còn khoảng 65 mg/L, nguyên nhân có thể do trong quá trình Autoclave đã làm thay đổi nồng độ). Tiến hành tương tự đối với vi khuẩn oxy hóa nitrit trên môi trường NOB đã điều chỉnh nồng độ N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 100 mg/L. Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp lại, ủ ở 28°C trên máy lắc với vận tốc 160

rpm trong điều kiện che tối. Sau 5 ngày nuôi xác định nồng độ TAN, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bằng phương pháp so màu quang phổ (APHA *et al.*, 2005). Khả năng oxy hóa ammonia được đánh giá thông qua hàm lượng TAN trong 5 mẫu nghiên cứu theo thời gian. Chúng vi khuẩn nào có khả năng oxy hóa ammonia tốt thì hàm lượng TAN có xu hướng giảm sau 5 ngày nghiên cứu, ngược lại đối với chúng vi khuẩn oxy hóa nitrite được đánh giá thông qua hàm lượng N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> giảm theo thời gian nghiên cứu.

**2.6 Xử lý số liệu**

Các số liệu thu thập được tính toán các giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và biểu đồ về sự biến thiên của chúng được vẽ bằng phần mềm Excel. Sự sai biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức (p<0,05) được xác định theo phương pháp phân tích One-way ANOVA một nhân tố ở độ tin cậy 95% bằng phép thử Duncan thông qua phần mềm SPSS 16.0.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa đạm**

Từ 32 mẫu bùn đáy của 32 ao nuôi tôm thẻ chân trắng khác nhau đã phân lập được 121 chủng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường thạch chọn lọc (Bảng 1). Trong đó, 58 chủng có khả năng phát triển trên môi trường AOB, 63 chủng có khả năng phát triển trên môi trường NOB.

**Bảng 1: Địa điểm và số lượng các chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm**

Địa điểm thu mẫu	AOB (chủng)	NOB (chủng)
Huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau	17	21
Huyện Ngọc Hiển, Tỉnh Cà Mau	6	8
Huyện Thới Bình, tỉnh Cà Mau	24	22
Huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh	11	12
Tổng số	58 chủng	63 chủng

**3.2 Đặc điểm hình dạng, sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn**

**3.2.1 Đặc điểm khuẩn lạc**

Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường AOB, đa số khuẩn lạc có dạng đồng tâm, bề mặt phẳng, trắng ngà, bìa nguyên, kích thước 0,5 – 4,1 mm. Tương tự trên môi trường NOB, khuẩn lạc có dạng đồng tâm, bề mặt phẳng, trắng đục, bìa nguyên chiếm đa số, kích thước 0,1 – 4,1 mm (Bảng 2).

**Bảng 2: Đặc điểm khuẩn lạc của 121 chủng vi khuẩn phân lập**

Hình thái	Đặc điểm	AOB (%)	NOB (%)
Hình dạng	Tròn nhỏ		42,86
	Tròn to	34,50	9,52
	Đồng tâm		47,62
Màu sắc	Trắng ngà		41,27
	Trắng đục	19,00	55,56
	Vàng cam		3,17
Dạng bìa	Nguyên	46,50	87,30
	Không đều		12,70
Độ nổi	Phẳng	55,20	79,40
	Mô		20,60

3.2.2 Đặc điểm tế bào vi khuẩn

Kết quả quan sát tiêu bản nhuộm Gram dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100X thu được kết quả như sau: 56/58 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường AOB (chiếm 96,6%), 62/63 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường NOB (chiếm 98,4%) là vi khuẩn Gram âm, trong đó các chủng vi khuẩn được phân lập trên cả 2 môi trường có tế bào hình que ngắn chiếm tỉ lệ cao nhất (Bảng 3).

**Bảng 3: Đặc điểm tế bào của các chủng phân lập**

Hình dạng	AOB (%)	NOB (%)
Que ngắn	34,5	46,0
Câu to	19,0	1,6
Câu nhỏ	24,1	23,8
Quả lê	19,0	27,0
Que dài	3,4	1,6

3.2.3 Đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Các chủng vi khuẩn phân lập được đều không có khả năng sinh bào tử. Trong số 58 chủng phân lập trên môi trường AOB, 39 chủng có khả năng di động, 42 chủng có phản ứng oxidase dương tính và

19 chủng có phản ứng catalase dương tính Trong số 63 chủng phân lập trên môi trường NOB, 54 chủng có khả năng di động, 56 chủng có phản ứng oxidase dương tính và 14 chủng có phản ứng catalase dương tính.

**3.3 Sàng lọc các chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm tiềm năng**

Tiến hành sàng lọc 118 chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm phân lập được dựa theo mô tả hình thái và nhuộm Gram của Pillay *et al.* (1989) (3 chủng vi khuẩn Gram dương đã được loại bỏ), sau 7 ngày nuôi và khảo sát phản ứng màu với Griess-Ilosvay có 45 chủng cho phản ứng dương tính (vi khuẩn oxy hóa đạm ammonia) và 47 chủng cho phản ứng âm tính với thuốc thử (vi khuẩn oxy hóa nitrite). Sau đó tiến hành đo nồng độ TAN và  $-NO_2^-$  kết quả xác định được 5 chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa đạm ammonia cao nhất lần lượt là CN8.1 (69,8%), CN2.1 (69%), CN6.1 (66,3%), TB7.2 (64,6%), TV3.1 (62,1%) và 5 chủng oxy hóa nitrite CN7.1, CN6.2, TB3.2, TB7.1, TV4.2 tương ứng với tỉ lệ chuyển hóa cao nhất là 74,7%; 74,9%; 72,1%; 70,5%; 71,3% cho nghiên cứu tiếp theo (Bảng 4).

**Bảng 4: Các chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm tiềm năng**

Chủng	Nguồn gốc	Oxy hóa ammonia (%)	Chủng	Nguồn gốc	Oxy hóa nitrite (%)
CN8.1	Cà Mau	69,8	CN7.1	Cà Mau	74,7
CN2.1	Cà Mau	69,0	CN6.2	Cà Mau	74,7
CN6.1	Cà Mau	66,3	TB3.2	Cà Mau	72,1
TB7.2	Cà Mau	64,6	TB7.1	Cà Mau	70,5
TV3.1	Trà Vinh	62,1	TV4.2	Trà Vinh	71,3

**3.4 Khả năng chuyển hóa đạm của các chủng vi khuẩn tuyển chọn**

3.4.1 Khả năng oxy hóa ammonia của các chủng vi khuẩn tiềm năng

**Biến động hàm lượng TAN**

Kết quả cho thấy sau 5 ngày nghiên cứu, hàm lượng TAN của chủng vi khuẩn nghiên cứu giảm

manh về cuối giai đoạn thí nghiệm nhưng xu hướng giảm không đều qua từng ngày (Bảng 5). Trong đó thí nghiệm với chủng TB7.2 có kết quả hàm lượng TAN giảm đi nhiều nhất từ  $61,5 \pm 7,2$  mg/L xuống còn  $37,5 \pm 5,8$  mg/L (tỷ lệ giảm đạt 39,02%), ngược lại đối với chủng TV3.1 có tỷ lệ chuyển hóa thấp nhất đạt 33,06% (từ  $59,5 \pm 4$  mg/L còn  $39,83 \pm 2,8$  mg/L), giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

**Bảng 5: Kết quả hàm lượng TAN biến động sau 5 ngày nghiên cứu**

Chủng	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
CN6.1	60,04±2,4 <sup>a</sup>	47,33±8,4 <sup>a</sup>	44,27±2,7 <sup>abc</sup>	42,97±2,6 <sup>ab</sup>	41,57±1,4 <sup>a</sup>	40,10±4,4 <sup>a</sup>
CN2.1	58,88±5,6 <sup>a</sup>	52,17±4,4 <sup>a</sup>	39,83±3,3 <sup>a</sup>	38,83±4,9 <sup>a</sup>	37,67±3,3 <sup>a</sup>	38,50±2,0 <sup>a</sup>
CN8.1	63,10±3,0 <sup>a</sup>	43,20±2,5 <sup>a</sup>	42,93±2,9 <sup>ab</sup>	40,97±2,2 <sup>ab</sup>	41,67±5,0 <sup>a</sup>	40,80±8,0 <sup>a</sup>
TB7.2	61,50±7,2 <sup>a</sup>	48,17±4,5 <sup>a</sup>	46,70±1,3 <sup>bc</sup>	46,10±1,4 <sup>b</sup>	44,40±5,5 <sup>a</sup>	37,50±5,8 <sup>a</sup>
TV3.1	59,50±4,0 <sup>a</sup>	51,23±2,5 <sup>a</sup>	48,00±2,2 <sup>c</sup>	44,33±2,0 <sup>ab</sup>	42,17±5,1 <sup>a</sup>	39,83±2,8 <sup>a</sup>

Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có một chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Biến động hàm lượng N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>**

Sau 5 ngày theo dõi, hàm lượng N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> có xu hướng tăng nhưng không đồng đều theo từng ngày (Bảng 6), hàm lượng N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> tăng cao ở ngày 2 và giảm mạnh vào ngày 3. Điều này có thể do vi khuẩn chuyển hóa nitrite đã phát triển làm cho NO<sub>2</sub><sup>-</sup> giảm nhanh. Kết quả nghiên cứu này có hiệu suất thấp hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Thị Trúc Mai (2019), ba dòng vi khuẩn gồm BLS1.3, BLW2.2 và BLW2.4 phân lập từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bạc Liêu có khả năng chuyển hóa nitrite cao và đạt trên 56,3% sau bảy ngày nuôi cấy, trong đó dòng vi khuẩn BLW2.2 có hiệu suất chuyển hóa nitrite cao nhất, đạt 97,2% sau ba ngày nuôi cấy.

Tương ứng với hàm lượng TAN ít nhất, chủng TB7.2 đạt nồng độ N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 0,15 ± 0,04 mg/L cao

hơn có ý nghĩa thống kê so với chủng TV3.1 (p<0,05) nhưng không có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Dựa trên đánh giá sơ bộ đặc điểm hình thái và hoạt tính oxy hóa ammonium đã tuyển chọn được chủng TB7.2 có khả năng oxy hóa mạnh ammonia sau 5 ngày nuôi đạt hiệu suất chuyển hóa 39,02%. Kết hợp các kết quả nghiên cứu về đặc điểm nhận dạng bằng phép thử sinh hóa chủng có hoạt tính oxy hóa amonia cao nhất đạt 79,1% của Hoàng Phương Hà và *ctv.* (2008) và Phạm Thị Tuyết Ngân (2012) cho thấy chủng TB7.2 có thể thuộc nhóm *Nitrosomonas* sp. và hiệu suất oxy hóa ammonia có phần thấp hơn. So với nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh và *ctv.* (2012) vẫn có kết quả thấp hơn, sau 7 ngày nuôi chủng AO<sub>10</sub> có khả năng oxy hóa ammonia 66,77 ± 4,61%.

**Bảng 6: Biến động hàm lượng N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sau 5 ngày nghiên cứu**

Chủng	Ngày 0 (mg/L)	Ngày 1 (mg/L)	Ngày 2 (mg/L)	Ngày 3 (mg/L)	Ngày 4 (mg/L)	Ngày 5 (mg/L)
CN6.1	0,05±0,03 <sup>a</sup>	0,19±0,09 <sup>a</sup>	0,37±0,09 <sup>a</sup>	0,21±0,08 <sup>a</sup>	0,19±0,05 <sup>ab</sup>	0,07±0,03 <sup>a</sup>
CN2.1	0,06±0,01 <sup>a</sup>	0,36±0,06 <sup>b</sup>	0,51±0,10 <sup>a</sup>	0,23±0,03 <sup>a</sup>	0,37±0,02 <sup>c</sup>	0,22±0,07 <sup>bc</sup>
CN8.1	0,05±0,02 <sup>a</sup>	0,32±0,04 <sup>b</sup>	0,51±0,04 <sup>a</sup>	0,40±0,10 <sup>b</sup>	0,21±0,09 <sup>ab</sup>	0,12±0,03 <sup>a</sup>
TB7.2	0,04±0,03 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,42±0,04 <sup>a</sup>	0,32±0,09 <sup>a</sup>	0,16±0,02 <sup>a</sup>	0,15±0,04 <sup>ab</sup>
TV3.1	0,04±0,01 <sup>a</sup>	0,18±0,02 <sup>a</sup>	0,47±0,06 <sup>a</sup>	0,42±0,10 <sup>b</sup>	0,28±0,07 <sup>bc</sup>	0,28±0,08 <sup>c</sup>

Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có một chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê (p>0,05).

**3.4.2 Khả năng chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn chọn lọc**

**Biến động hàm lượng N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>**

Kết quả đánh giá cho thấy hàm lượng nitrite giảm mạnh về cuối đợt thí nghiệm nhưng không theo xu hướng liên tục (Bảng 6). Tuy nhiên, đến ngày 5 thì các chủng vi khuẩn vẫn có khả năng xử lý nitrite rất tốt như TB7.1 và TV4.2 tương ứng với

tỷ lệ N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> giảm đi cao nhất lần lượt từ 91,6 ± 4,3 mg/L xuống 63,17 ± 2,5 mg/L (tỷ lệ giảm 31,64%), và từ 88,17 ± 2,8 mg/L còn 63,67 ± 6,7 mg/L (tỷ lệ giảm đạt 27,8%). Trong khi đó chủng CN7.1 có tỷ lệ giảm thấp nhất đạt 23% (87,67 ± 3,3 mg/L còn 67,5 ± 4,4 mg/L), sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

**Bảng 6: Kết quả hàm lượng N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> biến động sau 5 ngày nghiên cứu**

Chủng	Ngày 0 (mg/L)	Ngày 1 (mg/L)	Ngày 2 (mg/L)	Ngày 3 (mg/L)	Ngày 4 (mg/L)	Ngày 5 (mg/L)
TV4.2	88,2±2,8 <sup>a</sup>	84,3±4,6 <sup>a</sup>	86,5±3,5 <sup>a</sup>	73,3±5,8 <sup>a</sup>	67,0±3,0 <sup>a</sup>	63,7±6,7 <sup>a</sup>
CN6.2	91,2±4,3 <sup>a</sup>	79,5±4,4 <sup>a</sup>	88,8±6,8 <sup>a</sup>	68,8±2,6 <sup>a</sup>	71,7±1,2 <sup>bc</sup>	68,7±8,1 <sup>a</sup>
CN7.1	87,7±3,3 <sup>a</sup>	81,0±7,0 <sup>a</sup>	88,3±6,8 <sup>a</sup>	69,8±5,1 <sup>a</sup>	70,0±2,6 <sup>ab</sup>	67,5±4,4 <sup>a</sup>
TB7.1	91,6±4,3 <sup>a</sup>	79,8±6,3 <sup>a</sup>	85,7±6,5 <sup>a</sup>	72,8±9,0 <sup>a</sup>	72,7±0,3 <sup>bc</sup>	63,2±2,5 <sup>a</sup>
TB3.2	88,8±5,2 <sup>a</sup>	77,2±10,1 <sup>a</sup>	85,2±5,5 <sup>a</sup>	72,8±0,6 <sup>a</sup>	74,8±0,6 <sup>c</sup>	67,2±1,9 <sup>a</sup>

Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có một chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê (p>0,05).

**Biến động hàm lượng N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**

Qua quá trình khảo sát, hàm lượng N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> biến động và tăng nhanh ở 3 ngày cuối, riêng ngày thứ 4

lại có sự giảm xuống N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Cuối giai đoạn thí nghiệm, chủng TV4.2 có hàm lượng N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> cao nhất đạt giá trị từ 0,2 ± 0,06 mg/L lên đến 16,24 ± 1,75 mg/L và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với

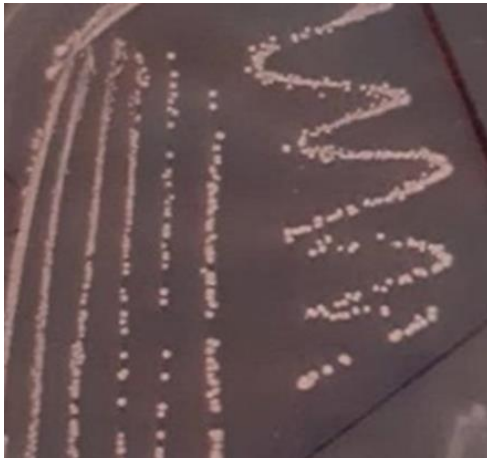
các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Chủng CN6.2 đạt hàm lượng  $N-NO_3^-$  thấp nhất là  $7,8 \text{ mg/L}$  ( $0,218 \pm 0,1 \text{ mg/L} - 8,002 \pm 0,3 \text{ mg/L}$ ), khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với dòng TV4.2 và CN7.1 nhưng không có ý nghĩa so với dòng TB7.1 và TB3.2. Như vậy, sau khi xác định hoạt tính của 5 chủng vi khuẩn thí nghiệm, tuyển chọn được chủng

TV4.2 có khả năng oxy hóa nitrite 27,8%, thuộc nhóm trực khuẩn Gram âm. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Hoàng Phương Hà và *ctv.* (2008), chủng oxy hóa nitrite cao nhất 79,2%. Theo nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh và *ctv.* (2012), chủng vi khuẩn có ký hiệu  $NO_2$  có khả năng oxy hóa nitrite  $84,17 \pm 0,11\%$ .

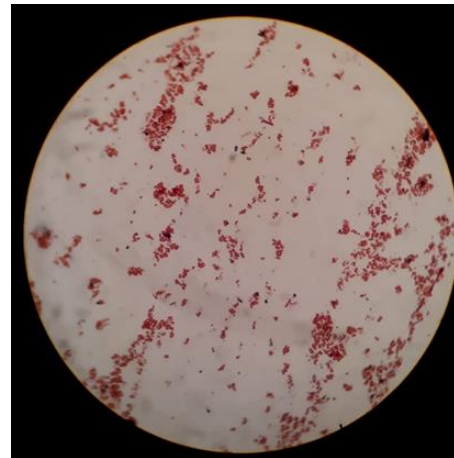
**Bảng 7: Biến động hàm lượng  $N-NO_3^-$  sau 5 ngày nghiên cứu**

Chủng	Ngày 0 (mg/L)	Ngày 1 (mg/L)	Ngày 2 (mg/L)	Ngày 3 (mg/L)	Ngày 4 (mg/L)	Ngày 5 (mg/L)
TV4.2	$0,20 \pm 0,06^a$	$0,63 \pm 0,06^c$	$1,13 \pm 0,05^a$	$9,12 \pm 0,79^b$	$8,95 \pm 0,98^a$	$16,24 \pm 1,75^c$
CN6.2	$0,22 \pm 0,09^a$	$0,66 \pm 0,03^c$	$1,14 \pm 0,06^a$	$7,02 \pm 1,14^a$	$7,20 \pm 0,39^a$	$8,00 \pm 0,32^a$
CN7.1	$0,16 \pm 0,07^a$	$0,18 \pm 0,03^a$	$1,11 \pm 0,13^a$	$6,02 \pm 0,97^a$	$6,98 \pm 0,29^a$	$11,60 \pm 0,30^b$
TB7.1	$0,25 \pm 0,07^a$	$0,59 \pm 0,02^c$	$0,97 \pm 0,30^b$	$6,89 \pm 1,68^a$	$8,23 \pm 1,40^a$	$10,56 \pm 0,86^{ab}$
TB3.2	$0,19 \pm 0,07^a$	$0,43 \pm 0,12^b$	$1,15 \pm 0,03^a$	$11,89 \pm 0,69^c$	$7,85 \pm 1,82^a$	$10,63 \pm 1,65^{ab}$

Các giá trị trung bình (TB)  $\pm$  độ lệch chuẩn (ĐLC) có một chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

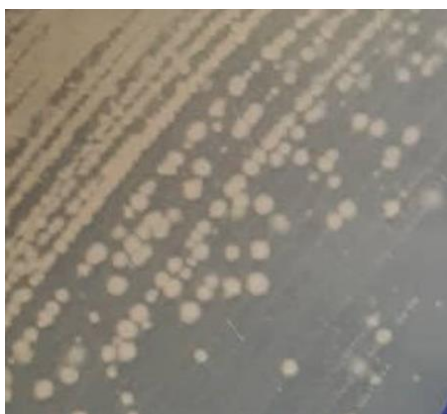


Hình dạng khuẩn lạc trên đĩa thạch AOB

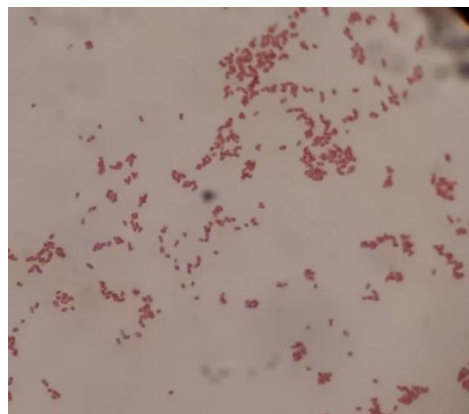


Hình dạng tế bào nhuộm Gram dưới kính hiển vi 100 X

**Hình 1: Hình dạng chủng vi khuẩn oxy hóa ammonia TV 7.2**



Hình dạng khuẩn lạc trên đĩa thạch NOB



Hình dạng tế bào nhuộm Gram dưới kính hiển vi 100 X

**Hình 2: Hình dạng chủng vi khuẩn oxy hóa nitrite TV 4.2**

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1 Kết luận

Từ 121 chủng vi khuẩn đã được phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm tiềm năng làm cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng tạo chế phẩm vi sinh gồm TB7.2 tương ứng với hiệu suất oxy hóa ammonia cao nhất 39,02% và hàm lượng NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sinh ra là 0,11 mg/L. Chủng TV4.2 có khả năng oxy hóa nitrite đạt hiệu suất 27,8% với hàm lượng nitrate sinh ra nhiều nhất, đạt 7,8 mg/L sau 5 ngày nghiên cứu.

### 4.2 Đề xuất

Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để định danh các chủng vi khuẩn tiềm năng, đồng thời nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh nhằm ứng dụng trong việc xử lý môi trường ao nuôi thủy sản.

### LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

American Public Health Association (APHA), 2005. Standard method for examination of water and wastewater, 21st edn. APHA, AWWA, WPCF, Washington, USA.

Barrow, G.H. and Feltham, R.K.A., 1993. Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 331.

Boyd, C. E., 1998. Water quality for pond aquaculture. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments Alabama Agriculture Experiment Station Auburn University, Auburn, Alabama. 37p.

Chankaew S., Thong S. O., and Sangnoi Y., 2017. 2018. Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. Chiang Mai Journal of Science. 44: 1-10.

Đặng Đình Kim, Nguyễn Văn Năm, Lại Thị Chí, và ctv., 2006. Nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh vật

xử lý nền đáy ao nuôi tôm cao sản. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I.

Hoàng Phương Hà, Trần Văn Nhị, Phạm Việt Cường và Nguyễn Thị Kim Cúc, 2008. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn nitrat hóa phân lập từ nước lợ nuôi tôm tại Quảng Bình và Hà Tĩnh. Nông nghiệp và phát triển nông thôn 2: 51-55.

Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Thị Trúc Mai, 2019. Phân lập vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite trong một số ao nuôi tôm ở Bạc Liêu. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(6B): 75-81.

Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh, Võ Ngọc Yến Nhi và Hoàng Xuân Tin, 2012. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn nitrat hóa để xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản. Tạp chí khoa học và công nghệ 3: 121-127.

Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012. Nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*). Luận án tiến sĩ, Khoa Thủy Sản, Đại học Cần Thơ, 159 trang.

Pillay B., Roth, G. and Oellermann, R. A., 1989. Cultural characteristics and identification of marine nitrifying bacteria from a closed prawn-culture system in Durban, South African Journal of Marine Science. 8(1): 333-343

Siripong, S., and Rittmann, B., 2007. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. Water Research, 41(5): 1110-1120.

Somsiri, T., Oanh, D.T.H., Chinabut, S., 2006. A simple device for sampling soft pond bottom sediment. Aquaculture. 258: 650-654.

Spieck, E. and Bock, E., 2005. The Proteobacteria, Part Introductory Essays. In: G.Garrity (Ed.). The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York, USA: Springer. 149-153.

Tăng Thị Chính và Đặng Đình Kim, 2007. Sử dụng chế phẩm vi sinh vật trong nuôi tôm cao sản, Viện Công nghệ Môi trường, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W. and Zhou, L. X., 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. Bioresource Technology. 102: 854-862.