

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CHUYỂN HOÁ ĐẠM TỪ Bùn Đáy AO CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Phạm Thị Tuyết Ngân¹, Vũ Hùng Hải¹,
Huỳnh Trường Giang¹, Vũ Ngọc Út¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa đạm từ bùn đáy ao nuôi cá tra được thực hiện nhằm bổ sung vào bộ sưu tập vi khuẩn hữu ích phục vụ nuôi trồng thủy sản. Trong nghiên cứu này, 80 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 HG4.1 có khả năng oxy hóa ammonia tốt nhất đạt 43% và chủng TN3.1 có hiệu suất oxy hóa nitrite đạt 32% sau 5 ngày. Hai chủng trên có đặc điểm là trực khuẩn Gram âm, có tiềm năng ứng dụng xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: Vi khuẩn chuyển hóa đạm, oxy hóa ammonia, oxy hóa nitrite, cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*).

1. GIỚI THIỆU

Trong các đối tượng nuôi trồng thủy sản, cá tra là một trong các đối tượng nuôi chính và phổ biến ở Việt Nam. Ngành nuôi cá tra đang phát triển mạnh mẽ với mục đích gia tăng kim ngạch xuất khẩu, thúc đẩy sự phát triển kinh tế xã hội, cải thiện đời sống người dân. Mục tiêu mà ngành thủy sản đang hướng tới là nuôi cá tra an toàn, hiệu quả, bền vững, thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, xu hướng gia tăng mật độ để tăng năng suất, kéo theo diện tích và sản lượng nuôi cá tra ở đồng bằng sông Cửu Long sẽ tăng rất nhanh, vấn đề môi trường cũng ngày càng trở nên quan ngại với sự tích lũy bùn bã hữu cơ từ thức ăn dư thừa, thuốc, hóa chất, kháng sinh làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường nuôi. Quá trình khoáng hóa nitơ của chất hữu cơ dư thừa dễ dẫn đến tích lũy N-NH_4^+ nếu không có quá trình nitrate hóa tiếp theo để chuyển hóa N-NH_4^+ thành N-NO_3^- .

Nhiều nhóm vi sinh vật hữu ích trong tự nhiên giữ vai trò quan trọng trong ao nuôi, trong đó ammonia được sinh ra từ sự bài tiết trực tiếp của động vật nuôi và quá trình phân huỷ nguồn thức ăn dư thừa. Chúng có thể gây độc cho động vật nuôi ở nồng độ rất thấp. Độc chất này có thể được loại bỏ bởi quá trình oxy hoá 2 bước của vi khuẩn. Bước đầu tiên oxy hoá ammonia thành nitrite chủ yếu bởi vi

khẩn thuộc *Nitrosomonas* sp. và bước tiếp theo oxy hoá nitrite thành nitrate chủ yếu bởi vi khuẩn thuộc *Nitrobacter* sp. (Lê Thanh Huyền và ctv., 2014). Nhóm vi khuẩn *Nitrosomonas* có khả năng oxy hoá N-NH_3 thành N-NO_2^- sau đó N-NO_2^- tiếp tục được oxy hoá thành N-NO_3^- (có lợi cho môi trường và thủy sinh vật) nhờ nhóm vi khuẩn *Nitrobacter* nhằm giảm thiểu sự hình thành khí độc N-NH_3 trong môi trường ao nuôi (Phạm Thị Tuyết Ngân và ctv., 2011).

Sử dụng các vi sinh vật hữu ích được phân lập từ bùn đáy và nước ao nuôi để giải quyết vấn đề quản lý nước nuôi là xu hướng hiện nay trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Hiện nay, ở nước ta chế phẩm sinh học được sử dụng rất phổ biến để cải thiện chất lượng nước chứa các chủng vi khuẩn thúc đẩy quá trình nitrate hóa như *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* (Gromen et al., 2001; Stephen et al., 1996). Mặc dù chế phẩm vi sinh có mặt trên thị trường nhiều thương hiệu khác nhau thành phần chủ yếu là vi khuẩn phân huỷ các chất hữu cơ là *Bacillus*. Để mở rộng thị trường chế phẩm vi sinh từ nguồn vi khuẩn tham gia quá trình chuyển hoá vật chất trong ao nuôi cá tra một cách tối ưu. Đề tài nghiên cứu “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hoá đạm từ bùn đáy ao cá tra (*P. hypophthalmus*)” được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn chuyển hoá đạm làm chế phẩm vi sinh phục vụ nuôi trồng thủy sản.

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ
Email: pttngan@ctu.edu.vn

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**2.1. Địa điểm thu mẫu bùn**

Địa điểm thu mẫu tại 3 tỉnh/thành phố là: An Giang, Cần Thơ và Hậu Giang. Phương pháp thu mẫu nền đáy bằng hệ thống ống PVC đã được tiệt trùng bằng dung dịch cồn 70% dựa theo tác giả Somsiri et al. (2006). Tại mỗi ao (diện tích dao động từ 800 – 2000 m²), 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, vị trí bùn được chọn là ở độ sâu từ 5-10 cm tính từ nơi tiếp xúc giữa bùn và nước. 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 cấy sinh vi khuẩn

Phương pháp phân lập và nuôi cấy sinh vi khuẩn từ mẫu bùn đã được mô tả bởi Chankaew et al. (2017), gồm các bước như sau: Cho 1 g mẫu bùn vào 20 mL môi trường AOB (bổ sung 1% NaCl) gồm 0,1 g MgSO₄·7H₂O; 13,5 g Na₂HPO₄; 0,7 g KH₂PO₄; 0,01 g FeCl₃; 0,18 g CaCl₂·2H₂O; 0,5 g NaHCO₃; 0,5 g (NH₄)₂SO₄ và 1000 mL nước cất (Spieck và Bock, 2005). Môi trường ammonium-calcium-carbonate được sử dụng để phân lập vi khuẩn AOB dựa theo phương pháp của Ehrlich (1975). Môi trường nuôi cấy sinh vi khuẩn AOB được chuẩn bị theo công thức môi trường của Lewis và Pramer (1958) và MacDonad và Spokes (1980). Môi trường được chuẩn bị trong bình 250 mL và nuôi ở 28°C trên máy lắc với vận tốc 160 rpm (vòng/phút) trong điều kiện che tối. Sau 7 ngày nuôi, tiến hành pha loãng mẫu và phân lập vi khuẩn trên môi trường thạch AOB (bổ sung 1% NaCl), ủ 28°C trong 7 ngày, chọn khuẩn lạc đơn có hình dạng và màu sắc khác nhau để tách riêng đến khi đạt được khuẩn lạc đơn và đồng nhất về mặt hình thái. Sau đó, các khuẩn lạc thuần được nuôi cấy 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 (Nitrite-oxidizing-bacteria) gồm các thành phần khoáng cơ bản như trên môi trường AOB được thay thế (NH₄)₂SO₄ thành NaNO₂ (Spieck và 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 rỗng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow và 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 H₂O₂ (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 - Phenylendiamin dihydrochlorid (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. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa (tính di động, oxy hóa ammonia, oxy hóa nitrite...) được xác định dựa theo cẩm nang của (Barrow và 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 NH₃ và NH₄⁺, 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 NO₂⁻ 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 (10^6 CFU/mL) đã được điều chỉnh mật độ quang OD_{600 nm} cho vào ống nghiệm 10 mL môi trường chuyên biệt AOB đã điều chỉnh nồng độ N-NH₄⁺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-NO₂⁻ 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-NO₂⁻, N-NO₃⁻ 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. Chủng 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 chủng vi khuẩn oxy hóa nitrite được đánh giá thông qua hàm lượng N-NO₂⁻ 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. Đặc điểm các chủng vi khuẩn oxy hóa ammonia (AOB)

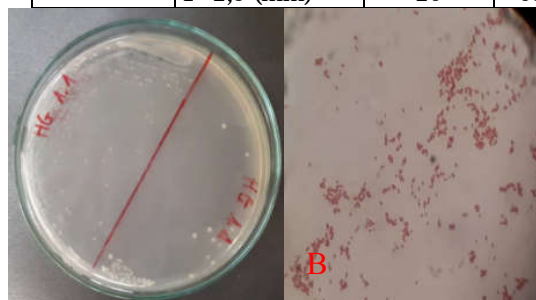
Từ 15 mẫu bùn của 15 ao đã phân lập được 40 chủng vi khuẩn oxy hóa ammonia. Các chủng vi khuẩn này được cấy trên môi trường thạch AOB. Sau 2 – 4 ngày thì đặc điểm về hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn đã được ghi nhận ở bảng 1.

Đặc điểm tế bào vi khuẩn: Hình dạng que ngắn chiếm 15/40 (tỷ lệ 37,5%), cầu to 2/40 (5%), cầu nhỏ 16/40 (40%), quả lê 7/40 (17,5%). Vi khuẩn gram âm 36/40 (90%), gram dương 4/40 (10%). Kết quả xác định đặc điểm sinh hóa đa số gram âm, catalase và oxydase dương tính, tế bào vi khuẩn có dạng hình

que và hình cầu, khuẩn lạc có dạng tròn hoặc đồng tâm, trắng ngà, mô, bìa tròn và kết quả nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của Cao Ngọc Diệp và ctv. (2014). Qua đó có thể kết luận các chủng vi khuẩn được phân lập thuộc nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonia.

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn oxy hóa ammonia

Đặc điểm	Hình thái	Số lượng khuẩn lạc	%
Màu sắc	Trắng đục	17	42,5
	Trắng ngà	23	57,5
Hình dạng	Tròn nhỏ	16	40
	Tròn to	8	20
	Tròn đồng tâm	1	2,5
	Đồng tâm	15	37,5
Dạng bìa	Tròn	24	60
	Không đều	16	40
Độ nổi	Mô	26	65
	Phẳng	14	35
Kích thước	0,1 – 1 (mm)	14	35
	1– 2,5 (mm)	26	65



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc của vi khuẩn trên đĩa thạch AOB (A) và hình dạng tế bào chúng CT1.3 quan sát ở vật kính 100X (B)

3.2. Đặc điểm các chủng vi khuẩn oxy hóa nitrite (NOB)

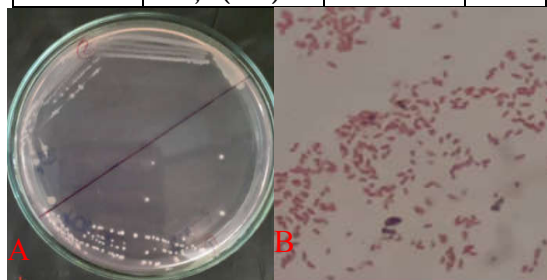
Từ 15 mẫu bùn của 15 ao đã phân lập được 40 chủng vi khuẩn oxy hóa nitrite. Các chủng vi khuẩn được cấy trên môi trường thạch NOB. Sau 2 – 4 ngày thì đặc điểm về hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn đã được ghi nhận ở bảng 2.

Đặc điểm hình dạng tế bào: que ngắn chiếm 19/40 (47,5%), cầu to 2/40 (5%), cầu nhỏ 13/40 (32,5%), quả lê 6/40 (15%). Vi khuẩn gram âm 40/40 (100%), không có vi khuẩn gram dương. Kết quả xác định gram âm, catalase và oxydase dương tính, tế bào vi khuẩn có dạng hình que và hình cầu, khuẩn lạc có dạng tròn hoặc đồng tâm, trắng ngà, mô, bìa tròn và kết quả nghiên cứu này tương tự với nghiên

cứu của Bùi Thế Vinh và *ctv.* (2011). Qua đó có thể kết luận các chủng vi khuẩn được phân lập thuộc nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrite.

Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn oxy hoá nitrite (NOB)

Đặc điểm	Hình thái	Số lượng khuẩn lạc	%
Màu sắc	Trắng đục	18	45
	Trắng ngà	22	55
Hình dạng	Tròn nhỏ	10	25
	Tròn to	24	60
	Tròn đồng tâm	2	5
	Đồng tâm	4	10
Dạng bờ	Tròn	25	62,5
	Không đều	15	37,5
Độ nổi	Mô	16	40
	Phẳng	24	60
Kích thước	0,1 – 1 (mm)	24	60
	1– 2,5 (mm)	16	40



Hình 2. Hình dạng khuẩn lạc của vi khuẩn trên đĩa thạch AOB (A) và hình dạng tế bào của chủng HG3.3 quan sát ở vật kính 100X (B)

3.3. Sàng lọc khả năng oxy hoá ammonia của vi khuẩn AOB

Kết quả sàng lọc khả năng giảm màu của 40 chủng vi khuẩn oxy hoá ammonia trong môi trường AOB cho thấy, sau 7 ngày nuôi tăng sinh tiến hành khảo sát khả năng oxy hoá ammonia của 40 chủng vi khuẩn bằng thuốc thử Griess –Ilosvay cho thấy có 29 ống dương tính cho phản ứng có màu hồng. Tất cả 29 chủng đều được xác định nồng độ TAN bằng phương pháp chuẩn độ đã chọn ra 5 chủng vi khuẩn đều có khả năng oxy hoá ammonia cao nhất dao động từ 50,6 – 63,8%.

3.4. Sàng lọc khả năng oxy hóa nitrite của vi khuẩn NOB

Kết quả sàng lọc khả năng giảm màu của 40 chủng vi khuẩn oxy hoá nitrite trong môi trường NOB cho thấy, kết quả khảo sát khả năng oxy hoá nitrite của 40 chủng vi khuẩn bằng thuốc thử Griess –Ilosvay cho thấy có 27 ống dương tính cho phản ứng không màu. Tất cả 27 chủng đều được xác định nồng độ N-NO₂⁻ bằng phương pháp chuẩn độ và đã chọn ra 5 chủng vi khuẩn đều có khả năng oxy hoá nitrit cao nhất dao động từ 66,1 – 69,7%.

3.5. Đánh giá khả năng oxy hóa ammonia của vi khuẩn AOB

3.5.1. Khả năng oxy hóa ammonia của vi khuẩn AOB

Kết quả xác định hàm lượng TAN sau khi bổ sung vi khuẩn AOB đã được mô tả trong bảng 3. Qua đó cho thấy TAN có xu hướng giảm từ 52,3 ± 2,46 – 29,8 ± 3,88 mg/L. Chủng HG4.1 oxy hoá ammonia cao nhất đạt 52,3 ± 2,46 – 29,8 ± 3,88 mg/L (hiệu suất oxy hoá là 43%) và đạt giá trị thấp nhất là chủng TN2.2 đạt 52 ± 2,78 – 34,0 ± 4,44 mg/L (hiệu suất oxy hoá là 34,6%).

Bảng 3. Hàm lượng TAN biến động sau 5 ngày thí nghiệm

Chủng	Ngày (mg/L)					
	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
TN2.2	52,0±2,78 ^a	41,8±5,10 ^a	40,1±2,93 ^a	38,5±3,27 ^a	36,1±3,75 ^a	34,0±4,44 ^a
HG2.4	51,0±3,12 ^a	39,3±5,83 ^a	36,8±6,33 ^a	34,6±4,85 ^a	33,1±3,25 ^a	32,1±7,18 ^a
HG4,1	52,3±2,46 ^a	38,1±3,83 ^a	37,3±3,70 ^a	36,5±5,07 ^a	32,3±6,11 ^a	29,8±3,88 ^a
CT1,3	50,6±3,51 ^a	36,5±3,60 ^a	36,5±2,29 ^a	35,8±3,05 ^a	34,1±6,60 ^a	32,5±7,00 ^a
HG3,3	50,1±3,87 ^a	39,0±3,50 ^a	36,3±4,48 ^a	35,5±3,05 ^a	33,5±3,50 ^a	30,8±5,25 ^a

Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có các ký tự mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.5.2. Khả năng oxy hóa nitrite của các chủng vi khuẩn tiềm năng

Hàm lượng N-NO₂⁻ của các chủng vi khuẩn tăng 0,02 ± 0,008 – 0,21 ± 0,07 mg/L sau 5 ngày thí nghiệm được mô tả bảng 4, trong đó chủng CT1.3

sinh ra hàm lượng NO₂⁻ nhiều nhất đạt 0,21 ± 0,07 mg/L và chủng tăng hàm lượng N-NO₂⁻ sinh ra thấp nhất là HG3.3 đạt 0,13 ± 0,03 mg/L. Mặt khác có sự biến động vào ngày 3 nồng độ N-NO₂⁻ của 5 dòng vi khuẩn có xu hướng giảm từ 0,12 ± 0,015 xuống 0,02 ±

0,008 mg/L, riêng HG2.4, HG4.1 và CT1.3 có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với TN2.2 và HG3.3.

Bảng 4. Hàm lượng $N-NO_2^-$ biến động sau 5 ngày thí nghiệm

Chủng	Ngày (mg/L)					
	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
TN2.2	0,03±0,006 ^a	0,03±0,033 ^a	0,04±0,010 ^a	0,04±0,006 ^a	0,11±0,031 ^a	0,17±0,06 ^a
HG2.4	0,04±0,011 ^a	0,08±0,041 ^{abc}	0,08±0,021 ^b	0,10±0,026 ^b	0,14±0,013 ^{ab}	0,16±0,02 ^a
HG4.1	0,07±0,014 ^a	0,10±0,032 ^{bc}	0,10±0,007 ^b	0,05±0,023 ^a	0,14±0,042 ^{ab}	0,15±0,03 ^a
CT1.3	0,05±0,022 ^a	0,06±0,018 ^{ab}	0,10±0,013 ^b	0,03±0,008 ^a	0,15±0,009 ^{ab}	0,21±0,07 ^a
HG3.3	0,06±0,021 ^a	0,12±0,015 ^c	0,11±0,038 ^b	0,02±0,008 ^a	0,18±0,048 ^b	0,13±0,03 ^a

Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có các ký tự mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.6. Đánh giá khả năng oxy hóa nitrite của vi khuẩn NOB

3.6.1. Khả năng oxy hoá nitrit của vi khuẩn NOB

Sau 5 ngày nuôi, các chủng vi khuẩn có khả năng làm giảm hàm lượng $N-NO_2^-$ được mô tả ở bảng 5. Kết quả cho thấy $N-NO_2^-$ giảm từ $95,1 \pm 13,1$ – $63,8$

± 14,0 mg/L. Chủng có giá trị cao nhất là chủng TN3.1 đạt $95,1 \pm 13,1$ – $63,8 \pm 14,0$ mg/L (hiệu suất chuyển hoá là 32%) và có giá trị thấp nhất là chủng HG4.4 đạt $88,6 \pm 10,1$ – $81,6 \pm 9,50$ mg/L (hiệu suất chuyển hoá là 7%).

Bảng 5. Biến động hàm lượng $N-NO_2^-$ trong 5 ngày thí nghiệm

Chủng	Ngày (mg/L)					
	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
HG1.3	94,8±20,2 ^a	90,8±6,17 ^a	80,8±4,53 ^{ab}	73,5±8,78 ^a	70,0±1,80 ^a	67,0±3,90 ^{ab}
TN4.4	95,1±10,8 ^a	82,5±3,96 ^a	80,0±1,80 ^{ab}	78,6±14,4 ^a	69,0±2,00 ^a	69,3±3,05 ^{ab}
HG4.4	88,6±10,1 ^a	86,5±8,00 ^a	80,1±7,81 ^{ab}	74,6±8,62 ^a	72,6±2,75 ^a	81,6±9,50 ^b
TN3.1	95,1±13,1 ^a	84,3±7,09 ^a	65,6±10,7 ^a	62,0±13,7 ^a	69,5±4,82 ^a	63,8±14,0 ^a
CT1.1	89,3±5,34 ^a	85,1±5,13 ^a	84,6±14,6 ^b	83,3±8,78 ^a	73,8±1,52 ^a	69,0±9,26 ^{ab}

Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có các ký tự mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.6.2. Biến động hàm lượng $N-NO_3^-$ trong 5 ngày thí nghiệm

Biến động hàm lượng $N-NO_3^-$ ở các nghiệm thức của các chủng vi khuẩn khác nhau tăng từ $0,20 \pm 0,05$ đến $18,7 \pm 2,87$ mg/L sau 5 ngày thí nghiệm (Bảng 6). Kết quả cho thấy nghiệm thức chủng TN3.1 có nồng độ $N-NO_3^-$ cao nhất ($0,28 \pm 0,05$ – $18,7 \pm 2,87$ mg/L) và hiệu quả tăng nồng độ $N-NO_3^-$ của chủng TN4.4 thấp nhất ($0,28 \pm 0,03$ – $12,8 \pm 3,01$ mg/L).

Mặt khác có sự biến động vào ngày thứ 4, tất cả các chủng đều giảm về nồng độ $N-NO_3^-$ riêng HG1.3 có sự khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức khác ($p < 0,05$). Mặt khác vào ngày 4 nồng độ $N-NO_3^-$ ở các nghiệm thức thí nghiệm 5 chủng vi khuẩn có xu hướng giảm từ $12,2 \pm 1,2$ đến $7,8 \pm 0,82$ mg/L, riêng $N-NO_3^-$ ở nghiệm thức chủng HG1.3 và TN3.1 khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với chủng TN4.4, HG4.4 và CT1.1.

Bảng 6. Biến động hàm lượng $N-NO_3^-$ trong 5 ngày thí nghiệm

Chủng	Ngày (mg/L)					
	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
HG1.3	0,20±0,05 ^a	0,56±0,02 ^a	1,10±0,06 ^b	7,6±1,60 ^a	9,6±2,36 ^{ab}	16,3±4,01 ^a
TN4.4	0,28±0,03 ^a	0,79±0,01 ^b	0,86±0,02 ^a	12,2±1,20 ^b	7,8±0,82 ^a	12,8±3,01 ^a
HG4.4	0,20±0,06 ^a	0,76±0,03 ^b	0,84±0,06 ^a	7,2±1,24 ^a	7,9±0,82 ^a	15,9±4,72 ^a
TN3.1	0,28±0,05 ^a	0,72±0,03 ^{ab}	0,88±0,02 ^a	15,0±0,90 ^c	9,5±1,78 ^{ab}	18,7±2,87 ^a
CT1.1	0,25±0,02 ^a	0,77±0,02 ^b	0,83±0,03 ^a	8,9±0,86 ^a	10,9±1,17 ^b	16,3±2,23 ^a

Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có các ký tự mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4. THẢO LUẬN

Như vậy sau khi đánh giá khả năng oxy hóa của 40 chủng vi khuẩn phân lập được đã tuyển chọn được 1 chủng vi khuẩn AOB có khả năng oxy hóa ammonia (HG4.1) tốt nhất có tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm vi sinh trong nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên chủng HG4.1 có khả năng oxy hoá ammonia là $52,3 \pm 2,46$ và sinh ra hàm lượng NO_2 cao nhất với $0,21 \pm 0,07$ mg/L có phần thấp hơn kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Linh và ctv. (2012) khi phân lập và sàng lọc vi khuẩn nitrat hoá để xử lý nước trong ao nuôi thủy sản (khả năng oxy hoá ammonia cao nhất đạt 66,77 mg/L, hàm lượng nitrit sinh ra nhiều nhất đạt 0,267 mg/L). Chủng có hiệu suất oxy hoá ammonia sau 5 ngày nuôi cấy là 43%. Kết quả nhuộm gram cho thấy cả 2 chủng này đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram (-), có dạng hình que ngắn. Như vậy nếu so sánh các kết quả nghiên cứu trước đây đã công bố như của tác giả Trần Liên Hà (2007), Phạm thị Tuyết Ngân (2012), Đào Thị Hồng Vân (2012) hay mô tả về hình thái giống *Nitrosomonas* của Spieck (2005) có thể kết luận các chủng HG4.1 và CT1.3 thuộc giống *Nitrosomonas*.

Đối với nhóm vi khuẩn NOB, dựa vào khả năng oxy hoá NO_2 đã tuyển chọn được chủng TN3.1 (từ 40 chủng phân lập được) có khả năng chuyển hoá cao với hiệu suất chuyển hoá 32% và sinh ra hàm lượng N-NO_3^- nhiều nhất ($18,7 \pm 2,87$ mg/L) nhưng có phần thấp hơn kết quả nghiên cứu của Trần Ngọc Hùng và Huỳnh Thị Kim Trang (2017) khi phân lập và thử nghiệm khả năng xử lý nitrite trong nước rỉ rác của vi khuẩn *Nitrobacter* sp. (hàm lượng nitrite giảm từ 121,12 xuống còn 0,18 mg/l sau 24 giờ nuôi cấy lác). Kết quả nhuộm gram cho thấy chủng này đều thuộc nhóm vi khuẩn gram (-), có dạng hình que ngắn. Theo các kết quả nghiên cứu trước đây đã công bố như của tác giả Trần Liên Hà (2007), Phạm thị Tuyết Ngân (2012), Đào Thị Hồng Vân (2012) hay mô tả về hình thái giống *Nitrobacter* của Spieck (2005) có thể kết luận các chủng TN3.1 thuộc giống *Nitrobacter*.

5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Trong 80 chủng vi khuẩn chuyển hoá đạm đã được phân lập, có 5 chủng vi khuẩn oxy hóa ammonia cao nhưng trong đó chủng HG4.1 oxy hoá ammonia hiệu quả nhất qua 5 ngày thí nghiệm (hiệu suất chuyển hoá là 43%). Ở 5 chủng vi khuẩn NOB oxy hoá nitrit trong đó hiệu quả nhất chủng TN3.1 chuyển hoá nitrite nhanh nhất trong 5 ngày thí

nghiệm (hiệu suất chuyển hoá là 32%). Hai chủng vi khuẩn này có tiềm năng ứng dụng sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ trong nuôi trồng thủy sản.

Tiếp tục định danh 2 chủng HG4.1 và TN3.1 bằng kỹ thuật sinh học phân tử và thử nghiệm khả năng làm giảm nitrite, nitrate ở qui mô lớn hơn nhằm làm cơ sở cho việc sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ cho nuôi trồng thủy sản bền vững.

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. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn tất cả thầy cô, cán bộ và các em sinh viên thực hiện đề tài tại Bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. APHA, AWWA, WEF, 2005. Standard method for the examination of water and wastewater (19th Edition). Washington DC, American Public Health Association (APHA).
2. Bùi Thế Vinh, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Diệp, 2011. Phân lập và nhận diện vi khuẩn chuyển hóa nitơ từ chất thải trại nuôi bò sữa, chất thải sữa và ứng dụng trong xử lý nước thải nhà máy sản xuất sữa. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ, số 18a: 194-200.
3. Cao Ngọc Diệp và Đoàn Tấn Lực, 2014. Phân lập, tuyển chọn và ứng dụng vi khuẩn chuyển hoá nitơ và photpho từ bãi rác để xử lý N và P trong nước rỉ rác. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ, số 33: 117-124.
4. Chankaew S., Thong S. O., Sangnoi Y., 2017. Nitrogen removal efficiency of salt-tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. Chiang Mai Journal of Science. 44(44):1-10.
5. Đào Thị Hồng Vân, 2012. Nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh vật bản địa nhằm xử lý nước thải sinh hoạt đô thị Hà Nội. Luận án tiến sĩ ngành Công nghệ sinh học thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
6. Grommen., R., Van Hautegehem, I., Van Wambelle, M., Verstraete, W., 2001. An Improved Nitrifying Enrichment to Remove Ammonium and Nitrite from Fresh Water Aquaria Systems.
7. Karen R., 2010. Catalase test protocol. American Society for Microbiology.

8. Lê Thanh Huyền, Đào Thị Ánh Tuyết, Đỗ Mạnh Hào, 2014. Một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn oxy hoá ammonium phân lập từ vùng ven biển Hải Phòng. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển, Số 3A: 152-158.
9. Nguyễn Văn Linh, Dương Nhật Linh, Võ Ngọc Yến Nhi và Hoàng Xuân Tin, 2012. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn nitrat hoá để xử lý nước trong ao nuôi thủy sản. Tạp chí Khoa học, số 3:26.
10. Patricia S. and Laura C., 2010. Oxidase test protocol. ASM Microbelibrary.
11. Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012. Nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển hoá đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*). Luận án tiến sĩ thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. 159 trang.
12. Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Ngọc Út, Trương Quốc Phú và Nguyễn Hữu Hiệp, 2011. Ảnh hưởng của vi khuẩn hữu ích lên các yếu tố môi trường và tôm sú (*Penaeus monodon*) nuôi trong bể. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ, số: 20b 59-68.
13. Spieck, E., Ehrich, S., Aamand, J. Eberhard Bock, 1998. Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Arch Microbiol* (169): 225-230.
14. Stephen, J. R., McCaig, A. E., Smith, Z. Prosser, I. M and Embley, M. T., 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S Ribosomal RNA gene sequences related to β -subgroup Ammonia Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4147-4154.
15. Trần Ngọc Hùng, Huỳnh Thị Kim Trang, 2017. Phân lập và thử nghiệm khả năng xử lý nitrit trong nước rỉ rác của vi khuẩn *Nitrobacter* sp.. Tạp chí Khoa học – Trường Đại học Thủ Dầu Một, số 3: 34.
16. 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. *Bioresour. Technol.* 102: 854-862.

ISOLATION AND SELECTION NITRIFYING BACTERIAL FROM SEDIMENT SAMPLES IN CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*) POND

Pham Thi Tuyet Ngan, Vu Hung Hai,
Huynh Truong Giang, Vu Ngoc Ut

Summary

The study was conducted to isolate and to select nitrifying bacteria from sediment samples of catfish culture ponds. In this study, 80 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, 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 (43%) and strain TN3.1 performed the highest nitrite oxidation efficiency (32%) after 5 days of incubation. Strain TB7.2 and TN3.1 are Gram-negative, rod bacteria and have high potential for water treatment in aquaculture.

Keywords: *Nitrifying bacteria, ammonia oxidation, nitrite oxidation, catfish (Pangasianodon hypophthalmus).*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Đức

Ngày nhận bài: 15/6/2020

Ngày thông qua phản biện: 16/7/2020

Ngày duyệt đăng: 23/7/2021