

ISOLATION AND SELECTION OF LOCAL NITRIFYING BACTERIA WITH HIGH ACTIVITY IN QUANG NINH, HAI PHONG

Hoang Phu Hiep^{1*}, Tran Thi Nguyet Minh², Hoang Thi Thanh Nga²

¹TNU - University of Education, ²Research Institute for Aquaculture No.1

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 25/6/2021</p> <p>Revised: 13/9/2021</p> <p>Published: 16/9/2021</p>	<p>Ammonia in the aquatic environment is one major problem that leads to damage in aquaculture. Ammonia is toxic to all vertebrates causing convulsions, coma and death. The isolation and selection of the local nitrifying bacteria are expected as a solution to reduce ammonia concentration and improve water quality. This study aimed to isolate and identify bacteria in Quang Ninh, Hai Phong province as the candidate to reduce ammonia. Bacteria were isolated in a selected liquid enrichment medium and identified by biochemical tests also molecular analysis of the 16S rRNA gene sequence. The result was isolated and selected eight nitrifying bacteria that have a high potential for application in aquaculture water treatment. By BLAST software on NCBI, 16S rRNA gene sequences of isolated nitrate bacteria were compared with bacterial strains on GenBank. The results showed that the identification was over 96.71% compared with the sequences on the Genbank. Nitrifying bacteria species were isolated include: <i>Nitrosomonas marina</i>, <i>Nitrosomonas nitrosa</i>, <i>Nitrosomonas aesturii</i>... in which, there are 2 characteristic species of bacteria, <i>Nitrosomonas europaea</i> and <i>Nitrobacter Winogradskyi</i>.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Isolation</p> <p>Nitrifying bacteria</p> <p>Ammonia-oxidizing bacteria</p> <p>Nitrit-oxidizing bacteria</p> <p>Aquaculture</p>	

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN NHÓM VI KHUẨN OXY HOÁ AMMONIA BẢN ĐỊA CÓ HOẠT TÍNH CAO TẠI QUẢNG NINH, HẢI PHÒNG

Hoàng Phú Hiệp^{1*}, Trần Thị Nguyệt Minh², Hoàng Thị Thanh Nga²

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

²Viện nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 1

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 25/6/2021</p> <p>Ngày hoàn thiện: 13/9/2021</p> <p>Ngày đăng: 16/9/2021</p>	<p>Ammonia trong môi trường nước là một trong những vấn đề chính dẫn đến thiệt hại trong nuôi trồng thủy sản. Ammonia là chất độc đối với tất cả các động vật có xương sống, ammonia là nguyên nhân gây co giật, hôn mê và tử vong. Quá trình phân lập và tuyển chọn các vi khuẩn nitrate hóa bản địa được hy vọng là giải pháp làm giảm nồng độ ammonia và cải thiện chất lượng nước. Nghiên cứu này đã phân lập và xác định được các vi khuẩn ở Quảng Ninh, Hải Phòng để khử ammonia. Vi khuẩn phân lập trong môi trường chọn lọc được định danh bằng phương pháp hoá sinh và phân tích trình tự gen 16S rRNA. Kết quả đã phân lập và tuyển chọn được 8 loài vi khuẩn nitrate có tiềm năng ứng dụng xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản. Bằng phần mềm BLAST trên NCBI, trình tự gen 16S rRNA của các vi khuẩn nitrate phân lập được so sánh với các chủng vi khuẩn trên GenBank. Kết quả cho thấy, tỷ lệ tương đồng đều đạt hơn 96,71% so với các trình tự gốc trên ngân hàng gen thế giới. Các loài vi khuẩn nitrate hóa được phân lập bao gồm: <i>Nitrosomonas marina</i>, <i>Nitrosomonas nitrosa</i>, <i>Nitrosomonas aesturii</i>... trong đó có 2 loài vi khuẩn đặc trưng nhất là <i>Nitrosomonas europaea</i> và <i>Nitrobacter Winogradskyi</i>.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Phân lập</p> <p>Vi khuẩn nitrit hoá</p> <p>Vi khuẩn oxy hóa ammonia</p> <p>Vi khuẩn oxy hóa nitrit</p> <p>Nuôi trồng thủy sản</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4694>

* Corresponding author. Email: hiephoangphu@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Trong nuôi trồng thủy hải sản, ammonia có nguồn gốc chủ yếu từ thức ăn, chất thải của sinh vật và từ sự phân huỷ các chất hữu cơ của vi sinh vật. Nồng độ ammonia có xu hướng tăng khi lượng thức ăn tăng lên để đáp ứng nhu cầu cho các loài thủy sản. Môi trường sẽ bị ô nhiễm nếu ammonia được thải trực tiếp vào môi trường mà không qua quá trình xử lý [1]. Các loài động vật thủy sinh cũng như các loài thủy sản có nguy cơ mắc bệnh và có thể chết nếu bị ngộ độc khí NH_3 [2]. Đối với các loài động vật có xương sống, nếu tiếp xúc lâu với ammonia có thể gây co giật, hôn mê và có thể dẫn đến chết. Bên cạnh các tác hại gây ngộ độc với động vật, ammonia còn gây mất cân bằng hệ sinh thái do kích thích sự phát triển mạnh của tảo (sự nở hoa của tảo). Trong tự nhiên tồn tại các nhóm vi khuẩn nitrate hóa và vi khuẩn oxy hóa ammonia, đây là những nhóm vi khuẩn chính có vai trò chuyển hoá ammonia [3]. Quá trình oxy hoá ammonia thành nitrit, sau đó nitrit bị oxy hoá thành nitrate. Trong điều kiện môi trường tự nhiên, mật độ nhóm vi khuẩn nitrate hoá thường thấp (khoảng 10^2 - 10^3 tế bào/ml) so với mật độ vi khuẩn tổng số (10^5 - 10^6 tế bào/ml). Bên cạnh đó, vi khuẩn nitrate hoá thường có tốc độ sinh trưởng chậm, thời gian thế hệ dài (12 - 32 giờ), khả năng sinh trưởng và phát triển chậm, khả năng cạnh tranh so với các nhóm vi khuẩn khác kém. Vì vậy, quá trình phân lập và làm giàu các vi khuẩn từ môi trường tự nhiên là một hướng để xử lý môi trường ô nhiễm ammonia. Năm 1890, Winogradsky lần đầu tiên mô tả vi khuẩn nitrate hoá [4]. Năm 2016, Karthik và cộng sự sử dụng kết hợp chế phẩm probiotic và vi khuẩn nitrate hoá làm giảm nồng độ ammoniac và tăng tỷ lệ sống của tôm [5]. Năm 2005, Alleman và Preston cũng nghiên cứu nhóm vi khuẩn nitrate hóa, kết quả cho thấy đây là nhóm vi khuẩn hiếu khí, tự dưỡng bắt buộc [6]. Nghiên cứu này góp phần phân lập, làm giàu và tuyển chọn các nhóm vi khuẩn oxy hoá ammonia bản địa từ môi trường tự nhiên thuộc 2 tỉnh Quảng Ninh và Hải Phòng nhằm tạo bộ sưu tập chủng giống phục vụ cho việc xử lý ô nhiễm ammonia trong các ao, hồ nuôi thủy hải sản.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu phân tích: Mẫu nước phân tích thu tại hai tỉnh là Quảng Ninh (điểm thu mẫu tại các huyện Đầm Hà, Hải Hà, Tiên Yên, Vân Đồn) và Hải Phòng (điểm thu mẫu tại Cát Bà và Đồ Sơn).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu: Mẫu được thu và bảo quản theo TCVN 6663-1: 2011 (ISO 5667-1: 2006) và TCVN 6663-3: 2008 (ISO 5667-3: 2006).

Xác định mật độ vi khuẩn nitrate hóa: Mật độ vi khuẩn nitrate hóa được xác định bằng phương pháp đa ống (MPN) [7]. Chuẩn bị môi trường Winogradsky ((thành phần môi trường: nước biển 1000 ml, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/l, K_2HPO_4 50 mg/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l, NH_4Cl 3,82 mg/l, CaCO_3 1000 mg/l) ở pH=8 được tiệt trùng 121°C trong 20 phút, môi trường được phân phối 9 ml vào dãy ống nghiệm. Cấy 1 ml dịch mẫu vào ống nghiệm và nuôi lắc 90 vòng/ phút ở phòng tối. Sau 15 ngày nuôi cấy, tiến hành kiểm tra nitrit trong các ống nghiệm để ghi nhận ống dương tính với vi khuẩn oxy hóa ammonia.

Làm giàu quần xã vi khuẩn oxy hóa ammonia: Chọn mẫu vật có mật độ vi khuẩn oxy hóa ammonia cao nuôi trong các bình tam giác chứa 250 ml môi trường Winogradsky, trong điều kiện lắc 90 vòng/ phút, trong tối. Thường xuyên lấy mẫu phân tích pH, lượng cơ chất tiêu thụ và bổ sung kiềm, cơ chất cho quần xã tiêu thụ.

Phân lập và thuần khiết các chủng vi khuẩn nitrate hóa: Mẫu đã làm giàu được nuôi cấy trên đĩa thạch hoặc bản silicagel có bổ sung môi trường Winogradsky [8]. Sau khi phân lập được các chủng vi khuẩn nitrate hóa thuần khiết sẽ tiến hành phân tích các đặc điểm hình thái bằng nhuộm tế bào [9], sinh hóa [10] và giải trình tự gen 16S rRNA.

Phương pháp xác định hoạt tính của các chủng vi khuẩn nitrate hóa: Hoạt tính oxy hóa amoni bằng hàm lượng amoni mất đi và nitrit tạo thành. Xác định hàm lượng amoni theo phương pháp Nessler, hàm lượng nitrit theo phương pháp Griss, nitrate theo phương pháp trắc quan với thuốc thử acid phenoldisunfonic [11], [12].

Định danh vi khuẩn nitrate hóa bằng gen 16S rRNA: Những dòng vi khuẩn có độ hữu hiệu cao được chọn để nhận diện bằng cách thực hiện các phản ứng PCR để xác định gen 16S rRNA sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCT-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'); sản phẩm PCR sẽ điện di trên gel agarose 0,8% và phổ điện di sản phẩm PCR được chụp hình với thang DNA 100 bp sau đó được giải trình tự ở công ty MACROGEN (Hàn Quốc), kết quả trình tự được so sánh với dòng vi khuẩn chuẩn ở ngân hàng dữ liệu của NCBI bằng phần mềm BLAST để nhận diện dòng vi khuẩn được giải trình tự gen 16S rRNA.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đánh giá mật độ vi khuẩn nitrate hoá ở khu vực nghiên cứu

Vi khuẩn oxy hóa ammonia tại các khu vực nghiên cứu được nuôi cấy và xác định số lượng trong môi trường lỏng tính theo phương pháp MPN. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đo vi khuẩn oxy hóa ammonia tại khu vực nghiên cứu

(đơn vị: MPN/ml)

STT	Tên mẫu	Tầng mặt	Tầng đáy
1	Đầm Hà 01	4,60.10 ²	4,40.10 ¹
2	Đầm Hà 02	2,60.10 ²	1,20.10 ¹
3	Hải Hà 01	5,40.10 ²	1,20.10 ²
4	Hải Hà 02	1,00.10 ²	0,00.10 ⁰
5	Tiên Yên 01	7,60.10²	2,40.10 ²
6	Tiên Yên 02	4,40.10 ²	3,60.10 ¹
7	Vân Đồn 01	3,00.10 ²	2,40.10 ¹
8	Vân Đồn 02	1,20.10 ²	4,00.10 ⁰
9	Đồ Sơn 01	1,20.10 ²	3,60.10²
10	Đồ Sơn 02	4,30.10 ²	7,20.10 ¹
11	Cát Bà 01	3,40.10 ²	1,20.10 ¹
12	Cát Bà 02	1,20.10 ²	4,00.10⁰

Kết quả bảng 1 cho thấy, mật độ vi khuẩn oxy hoá ammonia tại các điểm thu mẫu nằm trong khoảng 4,00 đến 7,60.10² MPN/ml. Tại các điểm thu mẫu, tầng mặt có mật độ vi khuẩn oxy hóa ammonia cao hơn so với tầng đáy. Nguyên nhân của vấn đề này là do nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonia đa số là vi khuẩn hiếu khí, tự dưỡng bắt buộc. Mật độ vi khuẩn oxy hóa ammonia ở tầng mặt dao động trong khoảng 1,20.10² đến 7,60.10² MPN/ml. Đối với tầng mặt, điểm lấy mẫu Tiên Yên 01 có mật độ vi khuẩn oxy hóa ammonia cao nhất (đạt 7,60.10²), thấp nhất là điểm Hải Hà 02 (1,00.10²). Mật độ nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonia ở tầng đáy dao động trong khoảng 4,00 đến 3,60.10² MPN/ml. Điểm lấy mẫu Đồ Sơn 01 có mật độ vi khuẩn oxy hóa ammonia cao nhất (3,60.10²) và điểm lấy mẫu Cát Bà 02 có mật độ vi khuẩn oxy hóa ammonia là thấp nhất (4,00.10⁰).

3.2. Kết quả làm giàu quần xã vi khuẩn oxy hóa ammonia có hoạt tính cao

Ba quần xã vi khuẩn oxy hóa ammonia được chọn lọc có hoạt tính tốt nhất (Hải Hà 01, Đồ Sơn 01, Tiên Yên 01) được nuôi tăng sinh, kết quả nuôi được thể hiện trong bảng 2.

Qua bảng 2 ta thấy, vi khuẩn oxy hóa ammonia đạt lượng tiêu thụ cơ chất lớn nhất vào ngày 16 dao động trong khoảng 3,38-4,05 mg/l. Ngày 17 lượng cơ chất tiêu thụ giảm dao động khoảng 3,37 -3,95 mg/l. Lượng nitrit tạo thành đạt giá trị thấp nhất sau 12 đến 15 ngày nuôi tương ứng

với thời gian lượng cơ chất tiêu thụ nhiều nhất. Nhưng đến giai đoạn từ sau 16, 17 ngày nuôi cấy thấy xuất hiện lượng nitrit dao động trong khoảng 0,18 đến 0,37 mg/l. Điều đó cho thấy là trong quần xã vi khuẩn oxy hóa ammonia có sự xuất hiện của nhóm vi khuẩn oxy nitrit và phát triển chậm hơn do hai nhóm vi khuẩn này đều thuộc nhóm vi khuẩn nitrate hóa. Sản phẩm của quá trình nitrit hóa là chất tham gia trong quá trình nitrate hóa, quá trình nitrate hóa diễn ra chậm hơn quá trình nitrit hóa. Vì vậy có thể phân lập được nhóm vi khuẩn nitrate hóa trong cùng một loại môi trường.

Bảng 2. Kết quả quá trình nuôi tăng sinh vi khuẩn oxy hóa ammonia

(đơn vị: mg/l)

Thời gian nuôi	Hải Hà 01		Đồ Sơn 01		Tiên Yên 01	
	[NH ₄ ⁺] tiêu thụ	[NO ₂ ⁺] đo được	[NH ₄ ⁺] tiêu thụ	[NO ₂ ⁺] đo được	[NH ₄ ⁺] tiêu thụ	[NO ₂ ⁺] đo được
0 ngày	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5 ngày	0,40	0,07	0,45	0,06	0,36	0,75
8 ngày	0,78	0,04	0,88	0,02	0,62	0,45
10 ngày	1,10	0,02	1,25	0,00	0,87	0,25
11 ngày	1,52	0,01	1,60	0,00	1,15	0,13
12 ngày	2,05	0,00	2,21	0,00	1,57	0,00
13 ngày	2,52	0,00	2,68	0,00	1,85	0,00
14 ngày	3,02	0,00	3,22	0,00	2,25	0,00
15 ngày	3,70	0,00	3,90	0,00	3,27	0,00
16 ngày	4,00	0,27	4,05	0,18	3,38	0,30
17 ngày	3,80	0,35	3,95	0,20	3,00	0,37

3.3. Kết quả phân lập vi khuẩn oxy hóa ammonia bản địa

Bảng 3. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn oxy hóa ammonia

Tên mẫu	Môi trường phân lập	Kí hiệu khuẩn lạc	Đặc điểm khuẩn lạc
Hải Hà 01	Tự dưỡng	H1W	Tròn, trắng, bề mặt láng, d=1mm
		H2W	Tròn, màu vàng, bề mặt láng, d= 2mm
		H3W	Không tròn, màu vàng, bề mặt gồ ghề, d= 1,5mm
	Silicagel	H4S	Màu vàng hóa nâu
		H5S	Màu trắng, hơi gồ ghề
Đồ Sơn 01	Tự dưỡng	D1W	Không tròn, màu vàng, bề mặt gồ ghề, ăn sâu xuống thạch, d=2mm
		D2W	Không tròn, trắng, bề mặt gồ ghề, lan rộng, d= 2mm
		D3W	Tròn, trắng, bề mặt nhẵn, d= 2mm
		D4S	Màu trắng, mặt hơi gồ ghề
	Silicagel	D5S	Màu trắng, nhót
		D6S	Màu vàng nhạt
		D7S	Màu vàng, mặt nhót
Tiên Yên 01	Tự dưỡng	T1W	Tròn, trong suốt, nhẵn, nhót, d= 1,2mm
		T2W	Tròn, trắng đục, mặt nhẵn, d= 1mm
		T3W	Tròn, tâm đục, rìa màng nhám, d= 0,75mm
		T4W	Không tròn, trắng, mặt nhám, d= 1,3mm
		T5W	Tròn, mặt nhám gồ ghề, màu trắng bề mặt dạng hình cây, d= 1mm
	Silicagel	T6S	Màu trắng, mặt hơi gồ ghề
		T7S	Màu trắng, nhót
		T8S	Màu vàng, hơi gồ ghề

Sau khi thu thập mẫu ở 12 khu vực và phân lập vi khuẩn oxy hóa ammonia trên môi trường Winogradskyi Agar và Bán gel Silica Winogradskyi, kết quả cho thấy có 3 mẫu có tiềm năng nitrit hóa tốt nhất được tuyển chọn. Trong đó, mẫu Hải Hà 01 phân lập được 5 chủng, Đồ Sơn 01 phân lập được 7 chủng, còn mẫu Tiên Yên 01 phân lập được 8 chủng (Bảng 3).

Tiếp theo, chúng tôi tiến hành xác định hoạt tính nitrit hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được trong các môi trường Winogradskyi có bổ sung cơ chất NH_4^+ . Kết quả thu được như bảng 4.

Bảng 4. Nồng độ cơ chất NH_4^+ và sản phẩm NO_2^+ tạo thành của các chủng vi khuẩn oxy hóa ammonia trước và sau nuôi 15 ngày

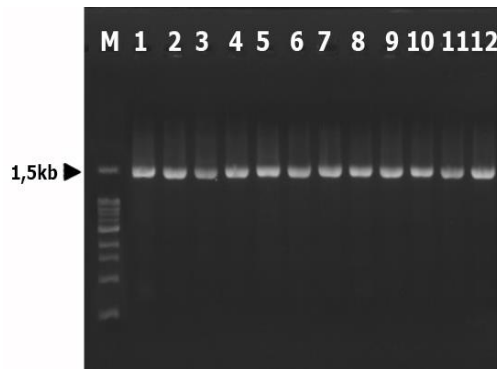
Tên mẫu	Môi trường phân lập	Kí hiệu khuẩn lạc	$[\text{NH}_4^+]$ ban đầu	$[\text{NO}_2^+]$ ban đầu	$[\text{NH}_4^+]$ sau nuôi	$[\text{NO}_2^+]$ sau nuôi	$[\text{NH}_4^+]$ tiêu thụ	$[\text{NO}_2^+]$ tạo ra
Hải Hà 01	Tự dưỡng	H1W	0,97	0	0,97	0	0	0
		H2W	0,97	0	0	0,22	0,97	0,22
		H3W	0,98	0	0,97	0	0,01	0
	Silicagel	H4S	0,97	0	0,32	0	0,65	0
		H5S	0,96	0	0,33	0,53	0,63	0,33
Đồ Sơn 01	Tự dưỡng	D1W	0,96	0	0,96	0	0	0
		D2W	0,97	0	0,95	0	0,02	0
		D3W	0,98	0	0	0,23	0,98	0,23
	Silicagel	D4S	0,96	0	0,34	0	0,62	0,34
		D5S	0,97	0	0,96	0	0,01	0
		D6S	0,99	0	0,33	0	0,66	0
		D7S	0,98	0	0,34	0,48	0,64	0,48
Tiên Yên 01	Tự dưỡng	T1W	0,98	0	0,97	0	0,01	0
		T2W	0,99	0	0,35	0,54	0,63	0,54
		T3W	0,97	0	0	0,23	0,97	0,23
		T4W	0,97	0	0,96	0	0,01	0
		T5W	0,98	0	0,32	0,53	0,66	0,53
	Silicagel	T6S	0,97	0	0,33	0,52	0,64	0,52
		T7S	0,98	0	0,98	0	0	0
		T8S	0,98	0	0,32	0	0,66	0

Qua bảng 4, kết quả cho thấy có 12 chủng gồm H2W, H4S, H5S, D3W, D4S, D6S, D7S, T2W, T3W, T5W, T6S, T8S làm giảm nồng độ $[\text{NH}_4^+]$, tạo ra sản phẩm hoặc tiêu thụ hết nồng độ $[\text{NO}_2^+]$ được ghi nhận là có hoạt tính nitrit hóa, có 08 chủng là H1W, H3W, D1W, D2W, D5S, T1W, T4W, T7S làm giảm ở mức thấp trong khoảng 0,01 - 0,02 mg/l hoặc không giảm nồng độ $[\text{NH}_4^+]$ và không tạo ra sản phẩm $[\text{NO}_2^+]$ được ghi nhận là không có hoạt tính nitrit hóa.

Chủng H2W, D3W, T3W có hoạt tính oxi hóa ammonia cao do có khả năng tiêu thụ $[\text{NH}_4^+]$ cao trong khoảng 0,97 - 0,98 mg/l và tạo thành $[\text{NO}_2^+]$ ở trong khoảng 0,22 - 0,23 mg/l. Chủng H4S, D4S, D6S, T8S có hoạt tính oxi hóa nitrit cao do tiêu thụ hết sản phẩm $[\text{NO}_2^+]$ tạo ra nhanh, nhưng hoạt tính oxi hóa ammonia không cao, mức tiêu thụ trong khoảng 0,62-0,66 mg/l. Còn lại các chủng H5S, D7S, T2W, T5W, T6S có hoạt tính nitrit hóa nhưng khả năng tiêu thụ $[\text{NH}_4^+]$ không cao, dao động trong khoảng 0,32-0,35 mg/l và $[\text{NO}_2^+]$ tạo ra trong khoảng 0,48-0,54 mg/l. Các chủng không có hoạt tính tiến hành tiêu hủy, các chủng được ghi nhận có hoạt tính tiến hành lưu giữ mẫu và phân loại.

Tiếp theo 12 chủng vi khuẩn sẽ được xác định tên chủng bằng gen 16S rRNA. Quá trình nhân bản đoạn gen 16S rRNA được tiến hành với cặp mồi đặc hiệu 27F và 1492R. Kết quả nhân gen bằng phản ứng PCR được thể hiện trên hình 1.

Trên điện di đồ (Hình 1) cho thấy, sản phẩm PCR ở các mẫu đều có kích thước khoảng 1,5kb. Kích thước này hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Các băng đều sáng, đậm, rõ nét và đủ điều kiện thực hiện thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Kết quả PCR các mẫu DNA vi khuẩn nitrate hóa

M: Marker 100bp; 1-12: H2W, H4S, H5S, D3W, D4S, D6S, D7S, T2W, T3W, T5W, T6S, T8S

Sau khi giải trình tự, chúng tôi tiến hành so sánh trình tự nucleotide đoạn gen 16S rRNA thu được của các chủng vi khuẩn oxy hóa ammonia này với trình tự gen 16S rRNA trên GenBank bằng công cụ BLAST. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả so sánh trình tự tương đồng bằng công cụ BLAST

STT	Chủng vi khuẩn	Tỷ lệ tương đồng (%)	Trình tự tương đồng	Tên loài tương đồng
1	H2W	99,64	NR_117649	<i>Nitrosomonas europaea</i>
2	H4S	99,58	NR_074324	<i>Nitrobacter Winogradskyi</i>
3	H5S	98,63	NR_104815	<i>Nitrosomonas marina</i>
4	D3W	99,64	NR_117649	<i>Nitrosomonas europaea</i>
5	D4S	97,85	NR_104819	<i>Nitrosococcus nitrosa</i>
6	D6S	99,51	NR_074324	<i>Nitrobacter Winogradskyi</i>
7	D7S	97,68	NR_104817	<i>Nitrosomonas halophila</i>
8	T2W	97,26	NR_027578	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>
9	T3W	98,20	NR_117649	<i>Nitrosomonas europaea</i>
10	T5W	96,71	NR_104818	<i>Nitrosomonas aesturii</i>
11	T6S	98,84	NR_104819	<i>Nitrosomonas nitrosa</i>
12	T8S	99,72	NR_074324	<i>Nitrobacter Winogradskyi</i>

Kết quả cho thấy, 12 chủng vi khuẩn thu được đều thuộc 2 giống *Nitrosomonas* và *Nitrobacter*. Tỷ lệ tương đồng đều đạt hơn 96,71% so với các trình tự gốc trên GenBank.

Như vậy, dựa trên các đặc điểm về hình thái, sinh hóa kết hợp với phương pháp sinh học phân tử đã phân lập được 7 loài vi khuẩn nitrate hóa thuộc 2 giống vi khuẩn. Hai loài vi khuẩn đặc trưng nhất là *Nitrosomonas europaea* và *Nitrobacter Winogradskyi* đều có trong các mẫu phân tích. Ngoài ra, còn có các loài vi khuẩn khác như: *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas nitrosa*, *Nitrosomonas aesturii*....

4. Kết luận

Đã xác định được mật độ vi khuẩn oxy hóa ammonia ghi nhận được tại các khu vực nghiên cứu dao động trong khoảng 4,00 đến 7,60.102 MPN/ml.

Đã phân lập được 20 chủng vi khuẩn từ 3 mẫu trong đó có 12 chủng có hoạt tính, còn lại 08 chủng không có hoạt tính, 12 chủng vi khuẩn đều thuộc 2 nhóm *Nitrosomonas* và *Nitrobacter*. Hai loài vi khuẩn đặc trưng nhất là *Nitrosomonas europaea* và *Nitrobacter Winogradskyi* đều có trong các mẫu phân tích.

Phân lập nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit trong cùng điều kiện phân lập nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Waikhom and R. George, "Ammonia and nitrite toxicity to Pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei*," *Semant Scholar*, 2018. [Online]. Available: <https://www.semanticscholar.org/paper/Ammonia-and-nitrite-toxicity-to-pacific-white-leg-Waikhom-George/ee054163efe3e6a56d510aff106d2742e3302b6f# citing-papers>. [Accessed August 15, 2020].
- [2] S. A. Kathyayani, M. Poornima, S. Sukumaran, A. Nagavel, and M. Muralidhar, "Effect of ammonia stress on immune variables of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* under varying levels of pH and susceptibility to white spot syndrome virus," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 184, pp. 1-13, 2019, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109626.
- [3] M. K. Sahu, N. S. Swarnakumar, K. Sivakumar, T. Thangaradjou, and L. Kannan, "Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives," *Indian J. Microbiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 175-184, 2008, doi:10.1007/s12088-008-0024-3.
- [4] S. Winogradsky, "Recherches sur les organismes de la nitrification," *Ann. inst. Pasteur*, vol. 4, pp. 213-231, 1890.
- [5] R. Karthik, A. C. Pushpam, Y. Chelvan, and M. C. Vanitha, "Efficiency of probiotic and nitrifier bacterial consortium for the enhancement of *Litopenaeus vannamei* Aquaculture," *Int. J. Vet. Sci. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 1-6, 2016, doi: 10.17352/ijvsr.000006.
- [6] J. E. Alleman and K. Preston, "Behavior and Physiology of Nitrifying Bacteria", 2005. [Online]. Available: <http://web.deu.edu.tr/atiksu/ana58/nitri.doc>. [Accessed August 15, 2020].
- [7] G. G. Ehrlich, "Water quality: Analytical Methods - Nitrifying bacteria (most probable number, MPN, method)" in: quality of water branch technical memorandum. *R. J. Pickering*, no. 75, p. 13, 1975.
- [8] A.G. Rodina, R. R. Colwell, and M. S. Zambruski, *Methods of aquatic microbiology*. University Park Press, Baltimore, MD. 1972
- [9] H. W. Seeley and P. Van Demark, *Selected exercises from Microbes in action, a laboratory Manual of Microbiology*. W H Freeman & Co.; 3rd edition, pp. 31-34, 1991.
- [10] T. M. D. Vu, *Microbiology practice*. Vietnam Education Publishing House, (In Vietnamese), 2001, pp. 27-34.
- [11] F. D. Hora and P. J. Webber, "A source of serious error in the determination of nitrates by the phenoldisulphonic acid method and its remedy," *Analyst.*, vol. 85, no. 567, pp. 567- 569, 1960.
- [12] L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, and A. D. Eaton, *Standard methods for the examination of water and wastewater 20th edition*. American Public Health Association, 1999.