

MỘT SỐ TÍNH CHẤT SINH HỌC CỦA VI KHUẨN KHỬ NITRATE HIẾU KHÍ PHÂN LẬP TẠI VÙNG NUÔI TÔM THƯƠNG PHẨM Ở VIỆT NAM

Hoàng Phương Hà, Đỗ Thị Liên, Cung Thị Ngọc Mai, Lê Thị Nhi Công

Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Sự hiện diện của các hợp chất nitơ vô cơ trong nước nuôi thủy sản đã và đang đặc biệt được quan tâm do các hợp chất chứa amoni và nitrite đã làm ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe động vật thủy sản như tôm, cá. Nitrite được hình thành trong các đầm nuôi thủy sản bởi hai quá trình nitrate hóa và khử nitrate không hoàn toàn. Nitrite được loại bỏ nhờ vi khuẩn hiếu khí oxy hóa nitrite thành nitrate và vi khuẩn kỵ khí khử nitrite đến sản phẩm cuối cùng là khí N_2 . Vào đầu những năm 1980, vi khuẩn khử nitrate hiếu khí đã được phát hiện. Trong bài báo này, chúng tôi đã tiến hành phân lập một số chủng vi khuẩn khử nitrate trong điều kiện hiếu khí. Kết quả cho thấy, đã sàng lọc được chủng vi khuẩn khử nitrate BL5 tại đầm ao nuôi tôm của tỉnh Bạc Liêu, có khả năng khử nitrate trong cả hai điều kiện kỵ khí và hiếu khí. Khả năng khử nitrate của BL5 đồng nghĩa với việc BL5 có khả năng khử nitrite trực tiếp. Kết quả cũng cho thấy, khả năng khử nitrite hiếu khí của chủng BL5 rút ngắn thời gian hơn so với khử nitrite kỵ khí, hiệu quả loại bỏ nitrite hiếu khí đạt trên 99% còn trong điều kiện kỵ khí chỉ đạt 55% sau 3 ngày với hàm lượng ban đầu là 10 mg N- NO_2 /L. Một số yếu tố sinh hóa lý đã được xác định; BL5 có hoạt tính khử nitrite tốt nhất trong môi trường có nồng độ NaCl 20‰; pH 7-8; nhiệt độ 20-37°C. Khuếch đại trình tự gen 16S rARN cho thấy chủng BL5 được xác định là *Pseudomonas* sp. BL5. Chủng vi khuẩn này sẽ được hứa hẹn cho mục đích đồng xử lý nước nuôi trồng thủy sản bị ô nhiễm amoni và nitrite khi kết hợp với vi khuẩn nitrate hóa.

Từ khóa: Hiếu khí, khử nitrate, nuôi trồng thủy sản, xử lý nước, vi khuẩn.

MỞ ĐẦU

Tại các đầm nuôi thủy sản nói chung và nuôi tôm thương phẩm nói riêng, các hợp chất nitơ như amoni và nitrite luôn được hình thành và tăng đến cấp số nhân trong quá trình nuôi tôm và độc cho tôm, chỉ với hàm lượng amoni (NH_4^+) 0,425 mg/l trong môi trường nước có thể gây độc cho tôm, cá và các động vật thủy sinh khác. Nitrite được tạo thành từ quá trình oxy hóa amoni và quá trình khử nitrate không hoàn toàn cũng gây độc đối với ấu trùng tôm, khi hàm lượng nitrite vượt mức cho phép nó làm giảm khả năng sinh trưởng, giảm vận chuyển oxy trong máu dẫn đến tôm bị stress, làm ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe tôm. Do vậy, cần phải có các biện pháp để xử lý các thành phần ô nhiễm này.

Có nhiều phương pháp để loại bỏ các hợp chất nitơ bao gồm trao đổi ion, hấp phụ, thẩm thấu ngược, điện phân, xúc tác và sinh học (Wang *et al.*, 2016). Nhưng nhược điểm chính của các phương pháp hóa lý nói trên là chi phí cao và sự hình thành các sản phẩm phụ sau khi xử lý, hơn nữa các quy trình này lại không phù hợp cho các ứng dụng tại chỗ (Sahinkaya *et al.*, 2011). Vì những lý do này, khử nitơ sinh học được coi là một quá trình phù hợp, hiệu quả và thân thiện với môi trường.

Chất thải nitơ trong các hệ thống tái sử dụng nước nuôi tôm có thể được loại bỏ thông qua hệ lọc sinh học nitrate hóa và khử nitrate. Cho đến nay, các hệ lọc nitrate hóa đã được thiết lập ổn định, nhưng hệ lọc khử nitrate vẫn đang được phát triển bằng nhiều con đường khác nhau kỵ khí và hiếu khí. Con đường khử nitrate kỵ khí bao gồm cả khử nitrite đến sản phẩm cuối cùng là khí nitơ (N_2) với sự tham gia của các vi sinh vật kỵ khí tùy nghi, với chất cho điện tử có nguồn gốc từ hữu cơ (khử nitrate dị dưỡng) hoặc các nguồn vô cơ (khử nitrate tự dưỡng): $NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow N_2O \rightarrow NO \rightarrow N_2$.

Vào đầu những năm 1980, quá trình khử nitrate hiếu khí đã được phát hiện với cơ chế có thể đồng thời sử dụng nitrate và oxy làm chất nhận điện tử (Robertson *et al.*, 1988), do đó nó đưa ra một lợi thế để vượt qua những hạn chế của việc khử nitrate sinh học truyền thống. So với quá trình khử nitrate kỵ khí, khử nitrate hiếu khí sẽ linh động hơn nên việc loại bỏ nitơ hiệu quả hơn và tốc độ phân hủy carbon hữu cơ cao hơn. Do vậy, khử nitrate bao gồm cả khử nitrite hiếu khí sẽ rất phù hợp trong các đầm ao nuôi tôm công nghiệp, thâm canh hay bán thâm canh. Việc kết hợp giữa khử nitrite hiếu khí với quá trình nitrate hóa hiếu khí sẽ làm tăng khả năng xử lý các hợp chất nitơ tại các đầm nuôi thủy sản, làm giảm nguồn carbon hữu cơ dư thừa và có thể đồng khử sunfat trong các hệ thống tuần hoàn nước. Robertson và đồng tác giả (1988) đã phân lập được chủng vi khuẩn khử nitrate hiếu

khí như *Paracoccus pantotropha*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas* sp. và *Alcaligenes faecalis* trong hệ thống khử nitrate - sulfur. Frette và đồng tác giả (1997) đã phân lập 16 chủng vi khuẩn khử nitơ từ bể xử lý nước thải kỵ khí/hiếu khí không liên tục, Wang và đồng tác giả (2007) đã phân lập được các chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*, *Delftia*, *Herbaspirillum* và *Comamonas* thể hiện khả năng khử nitrate mạnh. Cho đến nay, đã có nhiều công bố về vi khuẩn khử nitơ hiếu khí được phân lập từ các hệ sinh thái (Guo *et al.*, 2013, Han *et al.*, 2014, Duan *et al.*, 2015.). Mặc dù đã phát hiện được vi khuẩn khử nitrate hiếu khí, nhưng rất ít nghiên cứu điều tra, phân lập, tuyển chọn và ứng dụng tiềm năng của vi khuẩn khử nitơ hiếu khí để loại bỏ nitrate, nitrite trong nước nuôi trồng thủy sản. Do đó, cần có thêm thông tin liên quan đến vai trò của vi khuẩn khử nitrite hiếu khí áp dụng trong xử lý nước nuôi trồng thủy sản. Việc phát hiện các vi khuẩn khử nitơ hiếu khí này đã chứng tỏ sự tồn tại của chúng và thúc đẩy sự quan tâm trong các nghiên cứu về cơ chế khử nitơ của chúng trong điều kiện hiếu khí. Quá trình khử nitrite hiếu khí kết hợp với quá trình nitrate hóa sẽ xử lý triệt để amoni và nitrite mà không cần hệ thống hiếu khí, kỵ khí phức tạp nữa. Do vậy giảm được chi phí vận hành, nên giảm được giá thành công nghệ.

Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn khử nitrite hiếu khí BL5 đã được phân lập tại đầm nuôi tôm nước lợ của tỉnh Bạc Liêu, Việt Nam và được xác định là *Pseudomonas* sp. Khả năng khử nitơ trong điều kiện kỵ khí và hiếu khí cũng như các yếu tố hóa lý của chủng BL5 đã được đánh giá. Chủng BL5 đã được phân loại dựa vào việc so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA với các trình tự đoạn gen 16S rRNA khác trên ngân hàng gen. Chủng BL5 sẽ được sử dụng để xử lý nitrite của các đầm nuôi tôm nước lợ khi kết hợp với các chủng vi khuẩn nitrate hóa để xử lý triệt để amoni và nitrite bằng biện pháp sinh học.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu: Mẫu nước nuôi tôm tại Bạc Liêu, Việt Nam ký hiệu: BL1, BL2, BL3, BL4, BL5, BL6 và BL7, các mẫu được lấy từ các đầm nuôi tôm đã thu hoạch và được bảo quản ở 4°C trong các chai lấy mẫu chuyên dụng. Môi trường Winogradsky sử dụng để nuôi vi khuẩn khử nitrate với các thành phần như sau (g/L): Pepton (5), NaCl (5), cao nấm men (2), cao thịt (1), NaNO₃ (0,1), thạch (15), pH môi trường 7,5, nhiệt độ nuôi cấy và phân lập 37°C (Atlas, 1995).

Phân lập mẫu: Sau khi làm giàu, mẫu được pha loãng từ 10¹, 10²,..., 10⁶ (lần) rồi tiến hành phân lập trên môi trường Winogradsky khử nitrate thạch trong điều kiện kỵ khí sau 5 ngày, các khuẩn lạc bắt đầu hình thành và tiến hành nuôi tách riêng rẽ từng khuẩn lạc trong điều kiện kỵ khí.

Xác định khả năng sinh khí N₂ trong ống Durham: chuyển môi trường nuôi cấy vi khuẩn vào ống nghiệm có chứa ống Durham, tiến hành thí nghiệm trong điều kiện kỵ khí, cấy vi khuẩn vào từng ống nghiệm, đậy nút cao su, sau 6 - 7 ngày nếu vi khuẩn có khả năng khử nitrate sẽ sinh khí trong ống phao (Durham) và đẩy ống lên phía trên dịch nuôi cấy, ngược lại nếu vi khuẩn không có khả năng khử nitrate sẽ không thấy hiện tượng này.

Đánh giá khả năng khử nitrate hoặc nitrite trong điều kiện hiếu khí (nuôi lắc ở 150 v/ph). Môi trường sử dụng Winogradsky khử nitrate và nguồn nitơ được bổ sung vào là 10 hoặc 20 mg N-NO₃ (hoặc N-NO₂) tùy thuộc vào mỗi thí nghiệm; **Các phương pháp xác định hóa học:** Định lượng NO₂⁻ theo phương pháp Griss, định lượng NO₃⁻ theo phương pháp Brucine (Franson, 1995).

Ảnh hưởng của pH: Các giá trị pH nghiên cứu: 4; 6; 7; 7,5; 8 và 10.

Ảnh hưởng của NaCl: Môi trường nuôi cấy vi khuẩn khử nitrite được bổ sung NaCl với các nồng độ 5‰; 10‰; 20‰; 30‰; 40‰.

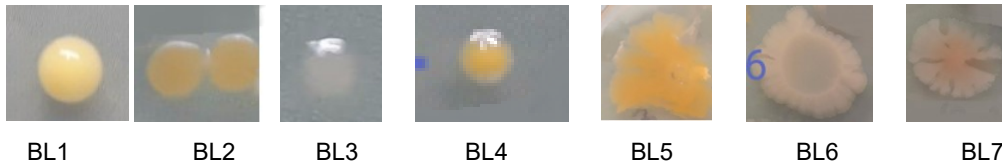
Ảnh hưởng của nhiệt độ: Dải nhiệt độ cho thí nghiệm được tiến hành là 4; 10; 20; 30, 37 và 40°C. Các nghiên cứu ảnh hưởng hóa lý này đều thực hiện ở điều kiện nuôi lắc 150 vòng/phút, theo dõi 2-3 ngày, môi trường Winogradsky khử nitrate nuôi ban đầu chứa 10 mg N-NO₂/L, thí nghiệm đối chứng (ĐC) là môi trường không chứa vi khuẩn và độ lặp lại của thí nghiệm là 3 lần, kết quả thể hiện bằng việc tính trung bình của 3 lần kết quả đạt được.

Phân tích trình tự gen 16S rRNA: Các phương pháp sinh học phân tử như tách chiết DNA tổng số và plasmid, kỹ thuật PCR, điện di DNA, nối ghép DNA, biến nạp, tinh sạch DNA được thực hiện theo Rainey và đồng tác giả (1996). Cặp mồi được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 16S rRNA với trình tự (27f 5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'; 1527r 5' AGAAAGGAGGTGATCCAGCC 3'). PCR được thực hiện với tổng thể tích 25 µl chứa: 2,5 µl đệm PCR 10x; 2,5 µl 2,5 mM dNTP; 2 µl 10 mM MgCl₂; 1 µl mồi 10 µM 16Sf; 1 µl 10 µM 16Sr; 1 µl DNA khuôn (≈ 100 µg/ml); 0,3 µl Taq DNA polymerase 1 U/µl; 15,7 µl H₂O. Chu trình nhiệt: 95°C/5 phút; 30 chu kỳ (95°C/30 giây; 60°C/30 giây; 72°C/1 phút 30 giây); 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR trên được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm Invitrogen và đọc trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100. Các trình tự 16S rRNA so sánh đã được lấy từ cơ sở dữ liệu ngân hàng gen của NCBI. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phương pháp bootstrap với 1.000 lần lặp lại để xây dựng cây phát sinh chủng loại. Dữ liệu trình tự thu được sắp xếp, so sánh bằng phần mềm Bioedit, Clustal X, Mega 4 và chương trình Blast trên ngân hàng Genbank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Neighbor - Joining, giá trị bootstrap với số lặp lại (replicate) là 1.000 lần.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tuyển chọn chủng vi khuẩn khử nitrate: Từ các mẫu nước nuôi tôm, tiến hành làm giàu và phân lập các chủng vi khuẩn khử nitrate trong điều kiện kỵ khí, sau 5 ngày đã phân lập được 7 chủng vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc khác nhau, cụ thể như sau:

- Chủng BL1: Khuẩn lạc hình tròn lồi trên mặt thạch, bóng, màu vàng, không nhân, d = 0,4 mm.
- Chủng BL2: Khuẩn lạc hình tròn, màu vàng cam, rìa trong, không nhân, khuẩn lạc nhỏ d = 0,3 mm.
- Chủng BL3: Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục, không nhân, d = 0,5 mm.
- Chủng BL4: Khuẩn lạc hình tròn, màu vàng, rìa mép bóng, không nhân, d = 0,3- 0,4 mm.
- Chủng BL5: Khuẩn lạc hình oval, màu vàng cam đậm, mép rang cưa, không nhân, d = 3 mm.
- Chủng BL6: Khuẩn lạc hình oval, màu hồng nhạt, mép gấp nếp, có nhân, d = 4 mm.
- Chủng BL7: Khuẩn lạc hình oval, màu hồng nhạt, mép gấp nếp chia thùy, có nhân màu hồng đậm, d = 2 mm.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của 7 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường khử nitrate

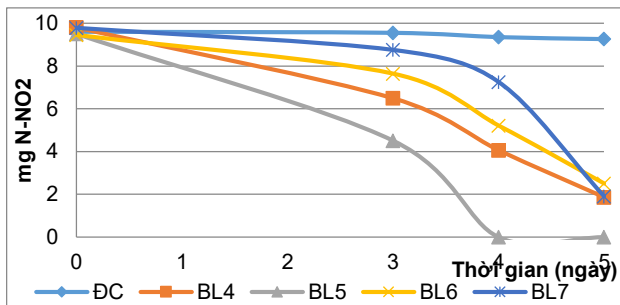
Bảy chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường khử nitrate có hình thái hoàn toàn khác nhau (Hình 1), có thể chúng thuộc những loài khác nhau. Các chủng vi khuẩn này ngoài việc sinh trưởng được trên môi trường khử nitrate thì hoạt tính khử nitrate cũng được đánh giá bằng cách nuôi tách riêng rẽ từng khuẩn lạc trong dịch môi trường với hàm lượng nitrate ban đầu là 20 mg N/L, điều kiện nuôi kỵ khí và có chứa ống Durham để đánh giá khả năng sinh khí của vi khuẩn trong điều kiện kỵ khí.

Bảng 1. Khả năng khử nitrate trong điều kiện kỵ khí của vi khuẩn phân lập

Mẫu	Hàm lượng nitrate (mgN-NO ₃ /L)	Hiệu suất chuyển hóa nitrate (%)	Hàm lượng nitrite (mg N-NO ₂ /L)
ĐC	19,85	0,75	0
BL1	3,78	80,65	15,8
BL2	3,51	82,45	16,5
BL3	5,1	74,5	7,11
BL4	4,95	75,25	0,1
BL5	1,06	94,7	0,05
BL6	2,2	89,0	0,06
BL7	2,85	85,75	0,04

Kết quả nhận được từ Bảng 1 cho thấy, so với đối chứng tất cả 7 chủng vi khuẩn nuôi trong điều kiện kỵ khí đều có khả năng chuyển hóa nitrate sau 7 ngày nuôi cấy, trong đó khả năng chuyển hóa nitrate của chủng BL5 là mạnh nhất đạt hiệu suất chuyển hóa 94,7 %, đặc biệt 4 chủng BL4, BL5, BL6 và BL7 không phát hiện được hàm lượng nitrite trong dịch nuôi cấy, điều này chứng tỏ có sự chuyển hóa tiếp đến sản phẩm cuối cùng trong chu trình khử nitrate. Ngoài ra, còn thấy xuất hiện bọt khí trong ống Durham của các chủng vi khuẩn này (không thể hiện bằng hình ở đây). Do vậy, BL4, BL5, BL6 và BL7 sẽ được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

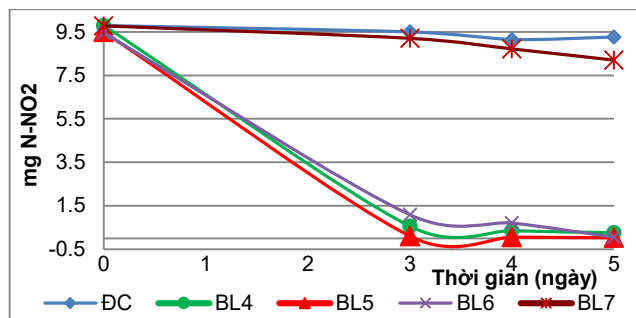
Bốn chủng vi khuẩn lựa chọn đã được đánh giá khả năng khử nitrite trong điều kiện kỵ khí, bằng cách đưa nitrite trực tiếp vào dịch nuôi cấy với hàm lượng ban đầu là 10 mg N-NO₂/L, thí nghiệm được theo dõi trong 5 ngày, kết quả được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2. Khả năng khử nitrate kỵ khí của vi khuẩn lựa chọn

Kết quả nhận được từ Hình 2 cho thấy, chủng BL5 có khả năng khử nitrite mạnh nhất, sau 3 ngày thì hiệu suất khử đạt 55 % và sang đến ngày thứ tư thì hiệu suất khử nitrite đạt 99,5%, theo sau chủng BL5 là chủng BL4, BL7, BL6 với hiệu suất khử nitrite lần lượt 81,4 % 81 %; 75 % sau 5 ngày.

Đánh giá khả năng khử nitrite trong điều kiện hiếu khí: Bốn chủng vi khuẩn BL4, BL5, BL6 và BL7 ngoài khả năng khử nitrite trong điều kiện kỵ khí, thì khả năng khử nitrite trong điều kiện hiếu khí cũng được xác định bằng cách chuyển mỗi chủng vi khuẩn lựa chọn vào mỗi ống nghiệm riêng biệt chứa môi trường với hàm lượng nitrite ban đầu là 10 mg N/L, nuôi lắc 150 vòng /phút.



Hình 3. Khả năng khử nitrite hiếu khí của vi khuẩn lựa chọn

Trong điều kiện hiếu khí, 3 chủng BL4, BL5 và BL6 đều có khả năng khử nitrite với hiệu quả gần như ngang nhau. Trong 3 ngày đầu tiên đã gần như không phát hiện nitrite trong dịch nuôi cấy của chủng BL5, hiệu quả loại nitrite trên 99%, còn chủng BL4 và BL6 đạt hiệu quả 95% và 90% tương ứng. Riêng chủng BL7 không thấy có hoạt tính khử nitrite trong điều kiện hiếu khí (Hình 3).

Như vậy, qua các thí nghiệm trên, các kết quả đã cho thấy, trong số 7 chủng vi khuẩn khử nitrate phân lập được có 4 chủng là BL4, BL5, BL6 và BL7 có khả năng khử nitrite cao nhất. Chủng BL7 chỉ có thể khử nitrate và nitrite trong điều kiện kỵ khí, còn

3 chủng BL4, BL5 và BL6 có khả năng khử nitrite hiếu khí và kỵ khí, nhưng BL5 có hoạt tính cao hơn 2 chủng còn lại. Khi so sánh hiệu quả khử nitrite của BL5 nhận thấy, sau 3 ngày hiệu quả khử nitrite chỉ đạt 55% trong điều kiện kỵ khí, nhưng đạt tới trên 99% trong điều kiện hiếu khí. Chủng BL5 có thể sẽ là tiềm năng để ứng dụng trong xử lý nước nhiễm nitrite, nó đáp ứng điều kiện hiếu khí hay kỵ khí. Do vậy, BL5 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu một số tính chất hóa lý và vị trí phân loại của nó.

Ảnh hưởng của NaCl đến sinh trưởng và hoạt tính khử nitrite của BL5: yếu tố độ mặn ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn lựa chọn rất quan trọng bởi khả năng đáp ứng của chúng với môi trường nuôi thủy sản.

Chủng BL5 có hoạt tính khử nitrite khá tốt ở hàm lượng NaCl 10‰, hoạt tính khử này tốt nhất ở NaCl 15‰ và 20‰, đạt hiệu suất trên 99 % sau 2 ngày. Tại nồng độ NaCl 30‰, sau 2 ngày hiệu suất khử nitrite chỉ đạt 88% nhưng đến ngày thứ 3 đã không phát hiện được thành phần nitrite này trong dịch nuôi cấy. Ở NaCl 40‰, hoạt tính khử nitrite rất kém và sau 3 ngày hàm lượng này cũng không thay đổi nhiều so với ngày đầu. Chủng BL5 mặc dù được phân lập tại đầm nuôi tôm nước lợ nhưng vẫn thấy có hoạt tính khử nitrite ở độ muối 0‰ (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của NaCl đến hoạt tính khử nitrite của BL5

Ngày	Hiệu suất xử lý nitrite (%)						
	NaCl 0%	NaCl 5%	NaCl 10%	NaCl 15%	NaCl 20%	NaCl 30%	NaCl 40%
0	100	100	100	100	100	100	100
1	25	39	53	58	95	42	2
2	48	55	90	98	98	88	5
3	75	78	99	99	99	99	8

Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng và hoạt tính khử nitrite: Các giá trị pH khác nhau đã được chuẩn bị như phần phương pháp, sinh khối vi khuẩn được nhân nuôi đạt mật độ 10⁸ CFU/ml sẽ được bổ sung với lượng 0,1 % vào các ống nghiệm có các giá trị pH khác nhau. Tiến hành nuôi lắc ở 150 vòng/phút trong 2 ngày.

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng và khử nitrite của BL5

pH	OD ₆₀₀	Hiệu suất xử lý nitrite (%)
2	0,05	5
4	0,14	31
6	0,19	45
7	0,41	95
7.5	0,425	98
8	0,75	91
10	0,294	22

Kết quả nhận được cho thấy, chủng BL5 có khả năng sinh trưởng ở phổ pH rộng từ pH4 đến pH10, khả năng sinh trưởng mạnh nhất ở dải pH7- pH8. Hoạt tính khử nitrite cao nhất ở pH7 và pH7,5, tại giá trị pH này hiệu suất loại nitrite đạt 95 % và 98 % tương ứng, ở pH 8 đạt khoảng 91 % và pH10 đạt 22 % (Bảng 3).

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính khử của BL5

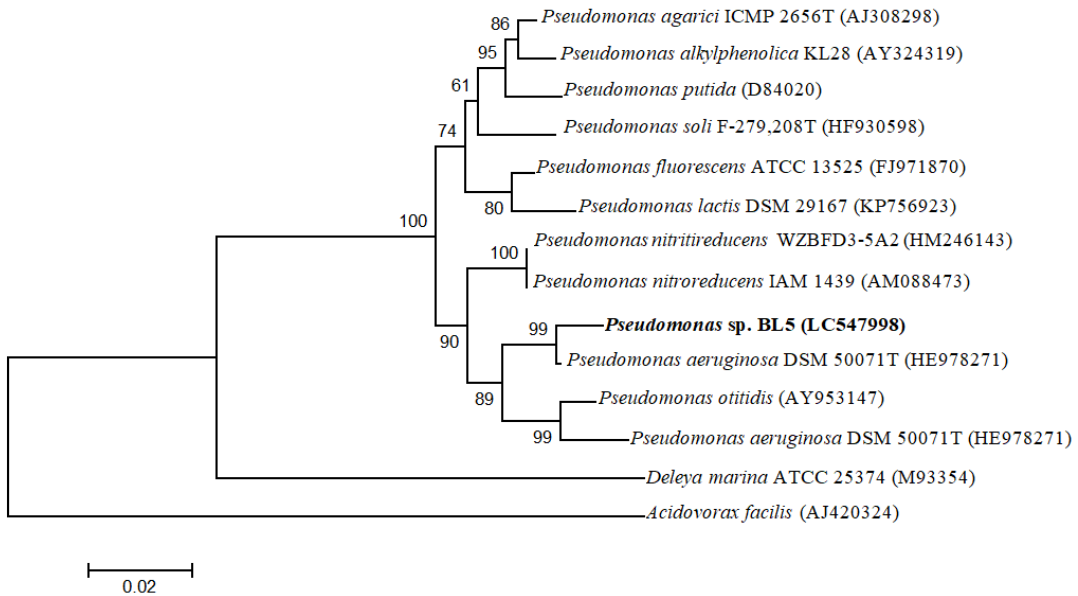
Nhiệt độ môi trường luôn ảnh hưởng lớn đến tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn nói chung và vi khuẩn khử nitrite nói riêng. Do vậy ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính khử nitrite của BL5 cũng được tiến hành, dải nhiệt độ thử nghiệm là 4°C; 10°C; 20°C; 30°C; 37°C và 40°C, đây là dải nhiệt độ thể hiện nhiệt độ theo mùa trong năm. Kết quả nhận được cho thấy, BL5 có khả năng khử nitrite ở nhiệt độ từ 10 - 37°C, hoạt tính tốt nhất nằm trong khoảng 20 - 37°C (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng nhiệt độ đến hoạt tính khử nitrite của chủng BL5

Ngày	Hiệu suất xử lý nitrite (%)					
	4°C	10°C	20°C	30°C	37°C	40°C
0	100	100	100	100	100	100
1	2	40	41	45	33	20
2	3	70	90	97	95	30
3	5	95	99	99	99	45

Định danh chủng BL5 bằng phương pháp phân tích trình gen 16S rRNA

Đoạn gen 16S rRNA của BL5 đã được khuếch đại và xác định trình tự. Sau đó trình tự gen này đã được so sánh với trình tự gen của các đại diện trên GenBank. Mỗi quan hệ phát sinh chủng loại của chúng đã được xác định và được thể hiện trên Hình 4. Trình tự gen 16S rRNA của chủng BL5 có độ tương đồng tới 99% (tỷ lệ che phủ (coverage) là 100%) so với trình tự của *Pseudomonas alcaligenes* ATCC 14909 và có độ tương đồng tới 97,6% (coverage 100%) so với trình tự của *Pseudomonas nitritireducens* WZBFD3-5A2 (HM246143) và *Pseudomonas nitroreducens* IAM 1439 (AM088473). Trình tự gen 16S rRNA của BL5 đã được đăng ký trên GenBank với mã số là LC547998 và chủng BL5 được đặt tên là *Pseudomonas* sp. BL5.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của BL5 (Giá trị Bootstrap được lặp lại 1000 lần; thước đo thể hiện 2 nucleotide khác nhau trên 100 nucleotide so sánh)

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã sàng lọc được chủng vi khuẩn khử nitrite BL5 tại đầm ao nuôi tôm của tỉnh Bạc Liêu. BL5 có khả năng khử nitrite trong cả hai điều kiện kỵ khí và hiếu khí, như vậy BL5 có khả năng khử nitrite trực tiếp, khả năng khử nitrite hiếu khí của BL5 rút ngắn thời gian hơn so với khử nitrite kỵ khí, đạt hiệu quả loại bỏ trên 99% nitrite trong điều kiện hiếu khí sau 3 ngày với hàm lượng ban đầu là 10 mg N-NO₂/L. Ảnh hưởng của một số yếu tố sinh hóa lý đã được xác định, BL5 có hoạt tính tốt nhất trong môi trường có nồng độ NaCl 20‰; pH 7 - 8; nhiệt độ 20 - 37°C. Từ kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rARN, chủng BL 5 được xác định là *Pseudomonas* sp. BL5.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Dự án sản xuất thử nghiệm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam mã số UDSXTN-03/20-21 và các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Atlat RM (1995). Media for environmental microbiologists. CRC Press USA342-344.
 Duan JM, Fang HD, Su B, Chen JF, Lin JM (2015). Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresour Technol* 179: 421-428.

- Franson MAH (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater (No. 628.161 S7).
- Frette L, Gejlsbjerg B, Westermann P (1997). Aerobic denitrifiers isolated from an alternating activated sludge system. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 363-3701.
- Guo LY, Chen QK, Fang F, Hu ZX, Wu J, Miao AJ, Xiao L, Chen XF, Yang LY (2013). Application potential of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier for nitrate and ammonium removal of eutrophic lake water. *Bioresour Technol* 142, 45-51.
- Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J System Evol Microbiol* 46(4): 1088-1092.
- Robertson LA, Cornelisse R, DeVos P (1989). Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek* 56: 289-299.
- Robertson LA, van Niel EWJ, Torremans RAM, Kuenen JG (1988). Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl Environ Microbiol* 54: 2812-2818.
- Sahinkaya E, Dursun N, Kilic A, Demirel S, Uyanik S, Cinar O (2011). Simultaneous heterotrophic and sulfur-oxidizing autotrophic denitrification process for drinking water treatment: Control of sulfate production. *Water Res* 45: 6661-6667.
- Wang P, Li XT, Xiang MF, et al. (2007). Characterization of efficient aerobic denitrifiers isolated from two different sequencing batch reactors by 16S-rRNA analysis. *J Biosci Bioengin* 103(6): 563-567.
- Wang JL, Chu LB (2016). Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnol Adv* 34: 1103-1112.

SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF AEROBIC DENITRIFYING BACTERIA ISOLATED IN COMMERCIAL BREEDING SHRIMP AREAS IN VIETNAM

Hoang Phuong Ha, Do Thi Lien, Cung Thi Ngoc Mai, Le Thi Nhi Cong

Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The presence of inorganic nitrogen compounds in aquaculture water was attracting attention because of the compounds containing ammonia and nitrite (NH_3 , NO_2^-) which directly affect the health of aquatic animals such as shrimp and fish. Nitrite is formed in aquaculture ponds by two processes including nitrification and incomplete denitrification. The nitrite is removed by aerobic bacteria that oxidize nitrite to nitrate and also nitrite-reducing anaerobic bacteria to N_2 gas as a final product. In 1980s, aerobic denitrifying strains were published. In this paper, we have isolated some strains of nitrate-reducing bacteria in aerobic conditions. The results showed that the BL5 strain which was able to reduce nitrate in both aerobic and anaerobic conditions was isolated from samples taken in shrimp pond of Bac Lieu province. Because the BL5 could aerobically directly remove nitrite, duration of aerobic nitrite removal by BL5 is shorter than anaerobic one. Removal efficiency was over 99% nitrite after 3 days with an initial content of 10 mg of $\text{N-NO}_2/\text{L}$. The physical and chemical factors were identified; BL5 were the best activity in the cultivation with NaCl 20‰; pH 7-8; temperature 20-37°C. By analysis the 16S rRNA gene sequence, BL5 has been identified as *Pseudomonas* sp. BL5. This bacterial strain will be promising for the purpose of co-treating ammonium and nitrite contaminated aquaculture water when combined with nitrifying bacteria.

Keywords: Aerobic, denitrification, aquaculture, bacteria, water treatment.

* Author for correspondence: Tel: 0988754668; Email: hahoangp@gmail.com