

PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC VI KHUẨN NITRAT HÓA ĐỂ XỬ LÝ NƯỚC TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh,
Võ Ngọc Yến Nhi, Hoàng Xuân Tin¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn nitrat hóa (AO_{10} , NO_2 và NO_6) có tiềm năng ứng dụng xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản. Các chủng vi khuẩn nitrat hóa này được phân lập từ 15 mẫu nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng và ao nuôi cá tra. Trong 3 chủng được lựa chọn, 2 chủng AO_{10} và NO_2 có đặc điểm là trực khuẩn Gram âm, chủng NO_6 là vi khuẩn Gram dương, có những đặc điểm phù hợp với nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit dị dưỡng, thuộc chi *Bacillus*.

Từ khóa: Vi khuẩn nitrat hóa, vi khuẩn oxy hóa nitrit, vi khuẩn oxy hóa amon, nuôi trồng thủy sản.

ABSTRACT

In this study, we have isolated and selected three nitrifying bacteria (AO_{10} , NO_2 và NO_6) that have high potential for application in aquaculture water treatment. The above mentioned nitrifying bacteria were isolated from fifteen aqua-culturing water samples of white shrimp and catfish ponds. In three selected strains, two of them AO_{10} and NO_2 are Gram-negative rod bacteria, NO_6 are Gram-positive rod bacteria, that have characteristics similar to group of heterotrophic nitrifying bacteria, belong to the genus *Bacillus*.

Keywords: Nitrifying bacteria, ammonia-oxidizing bacteria, nitrite-oxidizing bacteria, aquaculture, *Bacillus* sp. NO_6 .

MỞ ĐẦU

Amon là sản phẩm chính cuối cùng của quá trình dị hóa protein bởi cá, động vật giáp xác, động vật thân mềm và có thể tăng theo cấp số nhân trong trại giống và các trang trại nuôi thương phẩm, ngay cả với trường hợp thay nước thường xuyên. Sự tích lũy của amon gây ra tính độc và có thể gây ra tử vong cho động vật thủy sản, hàm lượng gây độc thay đổi tùy động vật thủy sản, đối với tôm sú không được lớn hơn 4.26 mg/L NH_4^+ (Colt et al., 1981; Chen et al. 1990). Amon tồn tại dưới dạng NH_3 hoặc NH_4^+ tùy thuộc vào pH môi trường. Trong môi trường có pH cao thì

amon dễ chuyển thành NH_3 , có độc tính cao. NH_3 có độc tính cao hơn NH_4^+ vì NH_3 có khả năng hòa tan trong chất béo, không mang điện tích nên dễ thấm qua tế bào (Allan et al., 1990)

Probiotic giúp cải thiện chất lượng nước trong ao nuôi trồng thủy sản (Moriarty, 1997). Nhóm vi khuẩn nitrat hóa giúp cải thiện chất lượng nước nhờ khả năng làm cân bằng sinh học $NH_3/NO_2/NO_3$. Quá trình cân bằng này sinh học này chủ yếu diễn ra nhờ các quá trình nitrat hóa và khử nitrat hóa (Sahu et al., 2008; Barnes et al., 1983). Nitrit là sản phẩm trung gian của quá trình nitrat hóa và khử

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Mở TP.HCM.

nitrat, gây độc cho động vật thủy sản chủ yếu là do tạo thành methemoglobin và giảm sự vận chuyển oxygen tới tế bào, hàm lượng không được vượt quá 0,3 mg/L (Hargreaves, 1998; Van de Graaf et al., 1995; Phạm Văn Ty et al., 2006). Độc tính của nitrat đối với tôm cá không cao, nhưng nếu hàm lượng vượt quá 10 mg/L sẽ gây hiện tượng phú dưỡng hóa, ảnh hưởng lớn đến môi trường thủy sinh (Phạm Văn Ty et al., 2006).

Vi khuẩn nitrat hóa được mô tả đầu tiên bởi Winogradsky (1890). Quá trình nitrat hóa được mô tả nhiều nhất với sự tham gia của nhóm vi khuẩn hóa năng tự dưỡng, Gram âm và hiếu khí bắt buộc. Chúng sử dụng năng lượng từ các quá trình oxy hóa này để sinh trưởng và đồng hóa CO₂ từ chu trình Calvin (Bock et al., 1992; Holt et al., 1994). Quá trình nitrat hóa dị dưỡng đã được mô tả lần đầu tiên vào năm 1894 do một loại nấm (Stutzer, Hartleb, 1894). Kể từ đó, nhiều báo cáo đã chứng minh rằng quá trình nitrat hóa không chỉ có ở nhóm vi khuẩn hóa năng tự dưỡng (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*,...) mà là hiện tượng phổ biến ở nấm và vi khuẩn dị dưỡng (Johnsrud, 1978; Brierly et al., 2001; Lin et al., 2007; Yang et al., 2011).

Nhiều nghiên cứu trên thế giới và ở nước ta cho thấy vi khuẩn nitrat hóa đóng vai trò quan trọng trong việc làm sạch nước nuôi trồng thủy sản ô nhiễm amon (Yang et al., 2011; Johnsrud, 1978; Brierly et al., 2001; Lin et al., 2007; Trần Liên Hà et al., 2007; Hoàng Phương Hà et al., 2008). Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tiến hành phân lập và tuyển chọn những chủng nitrat hóa có hoạt tính cao với mục đích ứng dụng xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Lấy từ mẫu nước mặt ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại xã Bình Khánh, huyện Cần Giò, thành phố Hồ Chí Minh và nước mặt ao nuôi cá tra tại thành phố Long Xuyên, An Giang.

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường khoáng cơ sở Winogradsky I và II (Colwell et al., 1972) được sử dụng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn. Xác định hoạt tính oxy hóa amon bằng hàm lượng amon mất đi và nitrit tạo thành, hoạt tính oxy hóa nitrit bằng hàm lượng nitrit mất đi và nitrat tạo thành. Xác định hàm lượng amon theo phương pháp phương pháp Nessler (Lenore et al., 1999), hàm lượng nitrit theo phương pháp Griss (Lenore et al., 1999), nitrat theo phương pháp trắc quan với thuốc thử acid phenoldisulfonic (Hora et al., 1960; Lenore et al., 1999). Tế bào vi khuẩn được nhuộm Gram (Seeley et al., 1981) và thử catalase đối với trực Gram dương (Barrow et al., 2003). Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi quang học Olympus (Nhật Bản).

Xử lý kết quả: kết quả được xử lý thống kê ANOVA của phần mềm Excel của Microsoft với độ tin cậy $P < 0,05$. Kết quả trình bày gồm giá trị trung bình \pm sai số chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập vi khuẩn nitrat hóa

Từ 5 mẫu nước mặt ao nuôi tôm tại Cần Giò, thành phố Hồ Chí Minh và 10 mẫu nước mặt ao nuôi cá tra tại Long Xuyên, An Giang chúng tôi đã phân lập được 12 chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa amon và 7 chủng có khả năng oxy hóa nitrit.

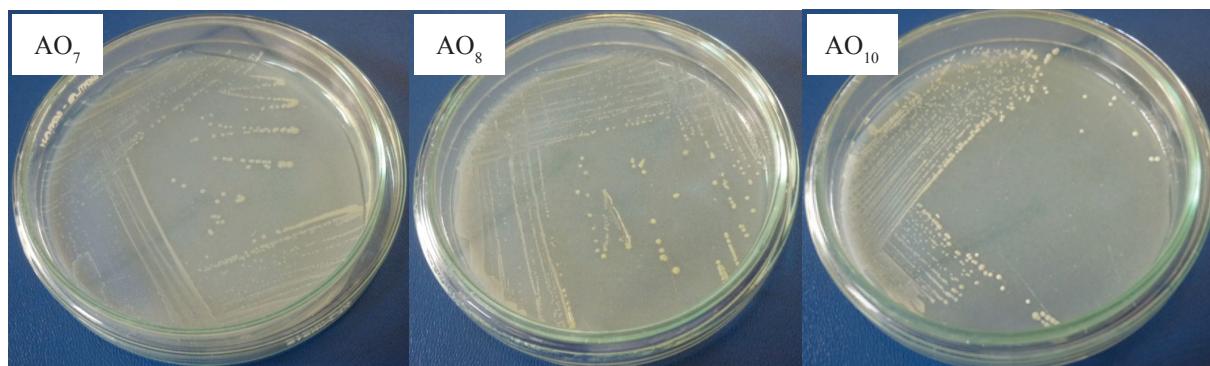
Vi khuẩn oxy hóa amon

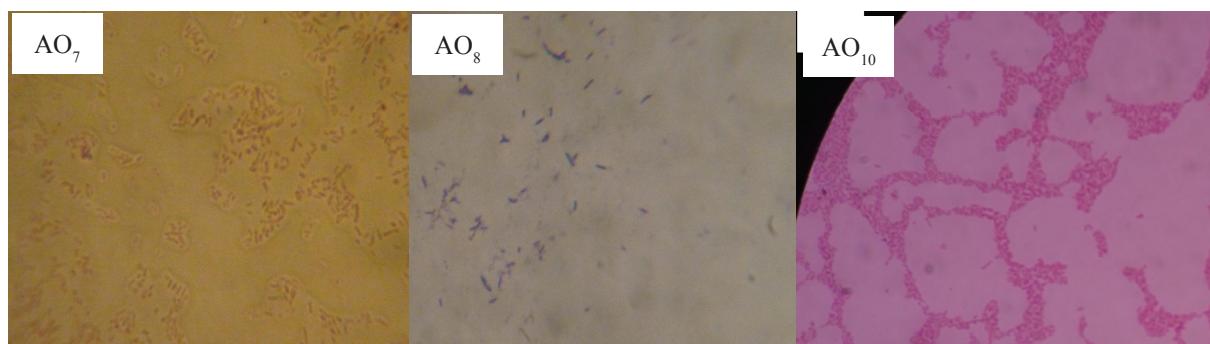
Kết quả phân lập vi khuẩn oxy hóa amon được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Kết quả phân lập vi khuẩn oxy hóa amon.

| STT | Mã chủng | Đặc điểm khuẩn lạc | Kích thước khuẩn lạc (mm) | Màu sắc khuẩn lạc | Kết quả nhuộm Gram | Hình dạng tế bào |
|-----|------------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| 1 | AO ₁ | Tròn, bề mặt lồi, trong | 1,0 | Xám | - | Trực ngắn |
| 2 | AO ₂ | Tròn đều, bề mặt lồi, bóng | 1,1 - 1,2 | Trắng | - | Trực ngắn |
| 3 | AO ₃ | Tròn, bề mặt lồi, bóng, tâm hồng | 1,2 | Hồng nhạt | - | Trực ngắn |
| 4 | AO ₄ | Tròn đều, bề mặt lồi, bóng | 1,0 - 1,1 | Vàng nhạt | - | Trực ngắn |
| 5 | AO ₅ | Tròn, bề mặt lồi, bóng | 2,0 | Hồng | - | Cầu trực |
| 6 | AO ₆ | Bề mặt lồi, bóng, mọc lan | 1,5 - 1,7 | Vàng | - | Cầu trực |
| 7 | AO ₇ | Tròn đều, bề mặt lồi, bóng | 1,0 - 1,1 | Trắng | - | Trực ngắn |
| 8 | AO ₈ | Tròn, bề mặt lồi, đục | 1 - 1,2 | Trắng | + | Trực |
| 9 | AO ₉ | Tròn đều, bề mặt lồi, bóng | 1,0 | Trắng | - | Trực ngắn |
| 10 | AO ₁₀ | Tròn đều, bề mặt lồi, bóng | 1,5 | Vàng nhạt | - | Trực ngắn |
| 11 | AO ₁₁ | Tròn, bề mặt lồi, bóng | 1,2 | Hồng | - | Trực ngắn |
| 12 | AO ₁₂ | Tròn đều, bề mặt lồi, bóng | 1,0 | Trắng | - | Trực ngắn |

Chủng AO₈ là chủng vi khuẩn Gram dương, có bào tử (hình 2), cho kết quả catalase dương tính, thuộc chi *Bacillus* (Barrow et al., 2003) và có khả năng oxy hóa amon dị dưỡng (Lin et al., 2007; Yang et al., 2011). Hình thái đại thể và vi thể của một số chủng được trình bày trong các hình 1 và 2.

Hình 1. Khuẩn lạc AO₇, AO₈ và AO₁₀ trên môi trường Winogradsky I.

Hình 2. Kết quả nhuộm Gram AO₇, AO₈ và AO₁₀.***Vi khuẩn oxy hóa nitrit***

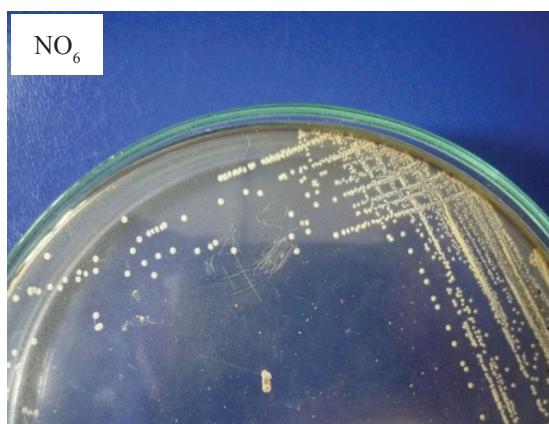
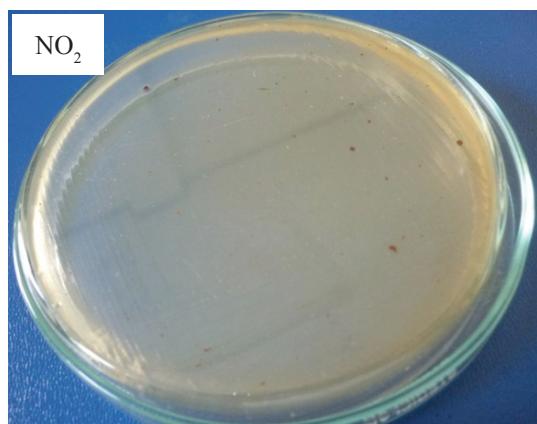
Kết quả phân lập vi khuẩn oxy hóa nitrit được trình bày trong bảng 2.

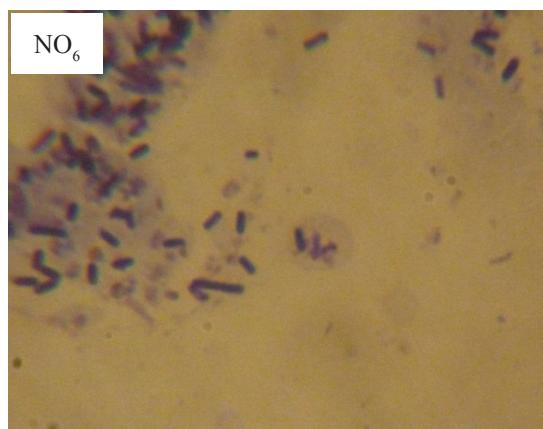
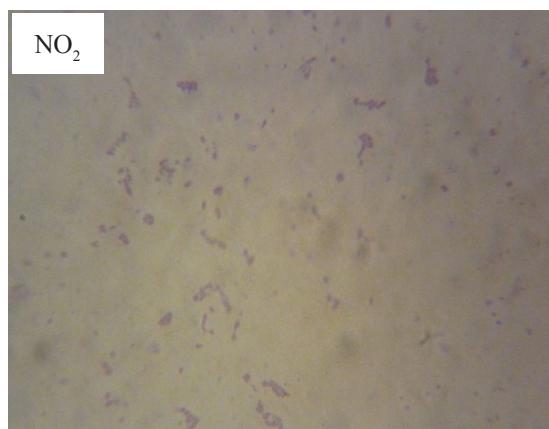
Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn oxy hóa nitrit

| STT | Mã chủng | Đặc điểm khuẩn lạc | Kích thước khuẩn lạc (mm) | Màu sắc khuẩn lạc | Kết quả nhuộm Gram | Hình dạng tế bào |
|-----|-----------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| 1 | NO ₁ | Tròn, bề mặt lồi | 1,0 | Trắng | - | Cầu trực |
| 2 | NO ₂ | Tròn đều, bề mặt lồi, bóng, đục | 0,5 | Vàng nhạt | - | Trực ngắn |
| 3 | NO ₃ | Tròn đều, bề mặt lồi | 0,5 | Hồng | - | Trực ngắn |
| 4 | NO ₄ | Tròn đều, bề mặt lồi, đục | 0,8 – 1,0 | Trắng | - | Trực ngắn |
| 5 | NO ₅ | Tròn, bề mặt lồi | 1,0 | Trắng | - | Trực ngắn |
| 6 | NO ₆ | Tròn, đục | 1,0-1,2 | Trắng | + | Trực |
| 7 | NO ₇ | Tròn đều, bề mặt lồi, bóng, trong | 1,0 | Nâu | - | Trực ngắn |

Chủng NO₆ là chủng vi khuẩn Gram dương, có bào tử (hình 4), cho kết quả catalase dương tính, thuộc chi *Bacillus* (Barrow et al., 2003) và có khả năng oxy

nitrit dị dưỡng (Lin et al., 2007; Yang et al., 2011). Hình thái đại thể và vi thể của một số chủng được trình bày trong các hình 3 và 4.

Hình 3. Khuẩn lạc NO₂ và NO₆ trên môi trường Winogradsky II

Hình 4. Kết quả nhuộm Gram chủng NO_2 và NO_6 **Kết quả khảo sát hoạt tính vi khuẩn oxy hóa amon**

Sau 7 ngày nuôi cấy, 12 chủng vi khuẩn oxy hóa amon và 7 chủng vi khuẩn

oxy hóa nitrit được xác định hoạt tính. Kết quả xác định hoạt tính oxy hóa amon và oxy hóa nitrit được trình bày trong bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3. Kết quả xác định hoạt tính của vi khuẩn oxy hóa amon

| STT | Vi khuẩn oxy hóa amon | Lượng NH_4^+ còn lại (mg/L) | Lượng NO_2^- sinh ra (mg/L) | Oxy hóa NH_4^+ (%) |
|-----|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | AO ₁ | 8,84 ± 0,04 | 0,111 ± 0,013 | 11,60 ± 0,35 |
| 2 | AO ₂ | 7,15 ± 0,14 | 0,139 ± 0,011 | 28,50 ± 1,41 |
| 3 | AO ₃ | 8,09 ± 0,49 | 0,101 ± 0,009 | 19,07 ± 4,87 |
| 4 | AO ₄ | 8,57 ± 0,06 | 0,088 ± 0,010 | 14,33 ± 0,62 |
| 5 | AO ₅ | 7,09 ± 0,09 | 0,115 ± 0,017 | 29,10 ± 0,85 |
| 6 | AO ₆ | 7,78 ± 0,41 | 0,086 ± 0,006 | 22,23 ± 4,14 |
| 7 | AO ₇ | 5,49 ± 0,01 | 0,175 ± 0,011 | 45,10 ± 0,06 |
| 8 | AO ₈ | 8,27 ± 0,003 | 0,172 ± 0,0002 | 17,27 ± 0,28 |
| 9 | AO ₉ | 6,87 ± 0,04 | 0,138 ± 0,007 | 31,33 ± 0,44 |
| 10 | AO ₁₀ | 3,32 ± 0,46 | 0,267 ± 0,022 | 66,77 ± 4,61 |
| 11 | AO ₁₁ | 9,20 ± 0,03 | 0,086 ± 0,005 | 07,97 ± 0,32 |
| 12 | AO ₁₂ | 8,78 ± 0,45 | 0,094 ± 0,004 | 12,23 ± 4,51 |

Theo kết quả bảng 3, sau 7 ngày nuôi cấy, chủng AO₁₀ có khả năng oxy hóa amon cao nhất (66,77 ± 4,61%), tương ứng với hàm lượng amon còn lại ít nhất (3,32 ± 0,46 mg/L) và hàm lượng nitrit sinh ra nhiều nhất (0,267 ± 0,022 mg/L). Các

chủng còn lại có khả năng oxy hóa amon từ 07,97 ± 0,32 % đến 45,10 ± 0,06 %. Chúng tôi tuyển chọn chủng có khả năng oxy hóa amon mạnh nhất trong 12 chủng là AO₁₀ (66,77 ± 4,61%).

Bảng 4. Kết quả xác định hoạt tính vi khuẩn oxy hóa nitrit sau 7 ngày nuôi cấy

| STT | Vi khuẩn oxy hóa nitrit | Lượng NO ₂ ⁻ còn lại (mg/L) | Lượng NO ₃ ⁻ sinh ra (mg/L) | Oxy hóa NO ₂ ⁻ (%) |
|-----|-------------------------|---|---|--|
| 1 | NO ₁ | 2,32 ± 0,03 | 2,18 ± 0,03 | 76,83 ± 0,26 |
| 2 | NO ₂ | 1,58 ± 0,001 | 7,37 ± 0,011 | 84,17 ± 0,11 |
| 3 | NO ₃ | 1,77 ± 0,04 | 6,53 ± 0,07 | 82,33 ± 0,41 |
| 4 | NO ₄ | 2,02 ± 0,09 | 2,82 ± 0,11 | 79,83 ± 0,92 |
| 5 | NO ₅ | 1,75 ± 0,02 | 7,05 ± 0,04 | 82,53 ± 0,2 |
| 6 | NO ₆ | 2,31 ± 0,011 | 6,77 ± 0,001 | 78,77 ± 0,22 |
| 7 | NO ₇ | 2,08 ± 0,03 | 5,71 ± 0,02 | 79,23 ± 0,3 |

Theo kết quả bảng 4, sau 7 ngày nuôi cấy, chủng NO₂ có khả năng oxy hóa nitrit cao nhất (84,17% ± 0,11), tương ứng với hàm lượng nitrit còn lại ít nhất (1,58 ± 0,001 mg/L) và hàm lượng nitrat sinh ra nhiều nhất (7,37 ± 0,011mg/L). Các chủng còn lại có khả năng oxy hóa nitrit từ 76,83 ± 0,26 % đến 82,33 ± 0,41 %. Chúng tôi tuyển chọn chủng mạnh nhất ở mỗi nhóm Gram, Gram âm là NO₂ (84,17 % ± 0,11) và Gram dương là *Bacillus sp.* NO₆ (78,77 % ± 0,22).

Như vậy, sau khi xác định hoạt tính của các chủng vi khuẩn nitrat hóa phân lập được, chúng tôi đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn nitrat hóa (AO₁₀, NO₂ và NO₆) có tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm vi sinh xử lý amon và nitrit trong nuôi trồng thủy sản. Chủng AO₁₀ có khả năng oxy hóa amon 66,77 ± 4,61% thuộc nhóm trực khuẩn Gram âm (hình 2), chủng NO₂ có khả năng oxy hóa nitrit 84,17 % ± 0,11 thuộc nhóm trực khuẩn Gram âm (hình 4) và chủng NO₆ có khả năng oxy hóa nitrit 78,77 % ± 0,22 thuộc chi *Bacillus*. Đối với hoạt tính oxy hóa amon, chủng AO₁₀ chúng tôi tuyển chọn được có khả năng oxy hóa amon (66,77 ± 4,61 %) có phần thấp hơn kết quả nghiên cứu của Hoàng Phương Hà và cộng sự (2008) - chủng có hoạt tính oxy hóa amon cao nhất sau 7

ngày nuôi cấy là 79,10% và cũng thấp hơn so với nghiên cứu của Lin và đồng tác giả (2007), chủng *Bacillus sp.* LY có khả năng xử lý amon là 74,7%. Đối với hoạt tính oxy hóa nitrit, chủng NO₂ chúng tôi tuyển chọn được có khả năng oxy hóa nitrit (84,17% ± 0,11 %) cao hơn kết quả nghiên cứu của Hoàng Phương Hà và đồng tác giả (2008) - chủng có hoạt tính oxy hóa nitrit cao nhất sau 7 ngày nuôi cấy là 79,2 %. Đối với chủng *Bacillus sp.* NO₆ mặc dù có hoạt tính oxy hóa nitrit thấp hơn chủng NO₂ nhưng vẫn được chúng tôi lựa chọn vì *Bacillus sp.* NO₆ thuộc nhóm oxy hóa nitrit dị dưỡng. Gần đây, có nhiều nghiên cứu về khả năng nitrat hóa dị dưỡng và chỉ ra rằng chúng có tiềm năng cao để ứng dụng và quá trình oxy hóa có thể diễn ra trong toàn bộ quá trình tăng trưởng theo hàm mũ (Papen et al., 1989).

KẾT LUẬN

Quá các quá trình phân lập và sàng lọc, chúng tôi đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn nitrat hóa có tiềm năng ứng dụng xử lý amon trong nuôi trồng thủy sản. AO₁₀ (oxy hóa amon 66,77 ± 4,61%), NO₂ (oxy hóa nitrit 84,17% ± 0,11) và *Bacillus sp.* NO₆ (oxy hóa amon 78,77 % ± 0,22).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Phương Hà, Trần Văn Nhi, Phạm Việt Cường, 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.
2. Trần Liên Hà, Phạm Tuấn Anh, Nguyễn Thị Thanh (2007), Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn nitrat hóa để ứng dụng trong xử lý nước ô nhiễm, *tạp chí Khoa học và Công nghệ* 45(3), Tr.95-100.
3. Phạm Văn Ty, Vũ Nguyên Thành (2006), *Công nghệ vi sinh và môi trường*, NXB Giáo dục.
4. Allan, GL, Maguire GB, Hopkins SJ (1990) Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. *Aquaculture* 9, 265-280.
5. Barrow, G. I., Feltham, R. K. A., 2003, *Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria*, pp. 86-90.
6. Barnes D., Bliss P.J., (1983), *Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment*. London: E & FN Spon Ltd., 1983.
7. Chen, J.C., Liu P.C., Lei S.C., (1990), Toxicity of ammonia and nitrit to *Penaeus monodon* adolescents, *Aquaculture* 89, 127-137.
8. Bock, E., Koops, H. P., Ahlers, B., Harms, H., (1992), Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., eds. *The prokaryote* 2nd Edn. Springer-Verlag, New York, 414-430.
9. Colwell, R.R., Zambruski, M.S., (1972), *Methods of aquatic microbiology*. University Park Press, Baltimore, MD.
10. Colt, J.E., and Armstrong, D.A., 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and molluscs. In: L.J. Allen and E.C. Kinney (Editors), *Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture*. Fish Culture Section, American Fisheries Society, Northeast Society of Conservation Engineers, Bethesda, MD, 34-47.
11. Chen J.C., Liu P.C., Lei S.C., (1990), Toxicity of ammonia and nitrit to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture* 89, 127-137.
12. Holt John G., Krieg Noel R., Sneath Peter H.A., Staley James T., Williams Stanley T., (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th edition, Lippincott Williams & Wilkins.
13. Hora F D., Webber P. J., (1960), A source of serious error in the determination of nitrats by the phenoldisulphonic acid method and its remedy. *Analyst*, 85, 567.
14. Hargreaves J.A., (1998), Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds, *Aquaculture* 166, 181-212.
15. Johnsrud S. C., (1978), Heterotrophic nitrification in acid forest soil, *Holarctic Ecol* 1, 27-30.
16. Brierly E. D. R., Wood M., (2001), Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium, *Soil Biol & Biochem* 33, 1403-1409.

17. Lenore S., Clesceri, Arnold E. Greenberg, Andrew D. Eaton, (1999), Standard Methods for the examination of water and wastewater 20th edition, American Public Health Association.
18. Lin, Y., Kong H.N., He Y.L., Lui, B.B., Inamori, Y., and Yan, L., (2007), Isolation and characterization of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain, Biomedical and Environmental Sciences 20, 450-455.
19. Moriarty D., (1997), The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 15, 333-349.
20. Papen, H., Von Berg, R., Hinkel, I., et al., (1989), Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O- and NO production in exponentially growing cultures, Appl Environ Microbiol 55, 2068-2072.
21. Sahu, M.K., Swarnakumar N.S., Sivakumar K., Thangaradjou T., Kannan L., (2008), Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives, Indian J. Microbiol, 175-184.
22. Seeley, H.W., Van Demark P., (1981). Gram stain. Selected exercises from Microbes in action, a laboratory Manual of Microbiology, 3rd edition, 31-34.
23. Stutzer, H., Hartleb R., (1894), Uber Nitratbildung. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg Abt 1 Orig Reihe A 22, 70.
24. Van de Graaf, A. A., A. Mulder, Peter de Bruijn, M. S. M. Jette, L. A. Robertson, J. Gijs Kuenen (1995), Anaerobic Oxidation of Ammonium Is a Biologically Mediated Process, Applied and Environmental Microbiology 61 (4), 1246-1251.
25. Winogradsky, S., (1890), Recherches sur les organismes de la nitrification. Ann. inst. Pasteur, 4, 213-231.
26. Yang, X.P., Wang, S.M., Zhang, D.W., Zhou, L.X., (2011), Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1, Bioresource Technology 102 (2011), 854-862.