

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa nitrite từ bùn đáy của vùng nuôi tôm hùm ở vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên

Trương Phước Thiên Hoàng*, Đỗ Huỳnh Dân, Võ Trần Quốc Thắng, Nguyễn Phú Hòa

Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 13/5/2021; ngày chuyển phân biện 17/5/2021; ngày nhận phân biện 21/6/2021; ngày chấp nhận đăng 1/7/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu đã thực hiện phân lập và tuyển chọn nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite từ vùng đáy lồng bè nuôi tôm hùm tại vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. Từ 21 mẫu bùn lấy từ khu vực 11 lồng bè nuôi tôm hùm đã phân lập được 16 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite. Sau khi tiến hành khảo sát đặc điểm sinh học và khả năng chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn, thu được 10 chủng có khả năng chuyển hóa nitrite trên 95% trong thời gian là 72 giờ, 10 chủng vi khuẩn có hiệu suất xử lý NO_2^- cao nhất được định danh sinh hóa bằng kit API 20E, API 20NE và phương pháp giải trình tự gen vùng 16S RNA, tra cứu trên BLAST SEARCH đã xác định được 5 loài là *Stenotrophomonas pavanii*, *Chryseobacterium gleum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia lacustris*, *Acinetobacter junii*.

Từ khóa: nitrite, nuôi tôm hùm lồng bè, vi khuẩn chuyển hóa nitrite, vịnh Xuân Đài.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, ngành nuôi thủy sản lồng bè (trong đó có nuôi tôm hùm) ở nhiều địa phương đang phải đối mặt với những khó khăn có thể dẫn đến nguy cơ thất bại. Nguyên nhân chính là do ô nhiễm môi trường nước vùng nuôi, dịch bệnh và hệ thống sinh thái bị phá hủy. Đặc biệt, ở các đầm phá/vịnh có hoạt động nuôi trồng thủy sản, nước lưu thông không thông thoáng vào một số thời điểm trong năm. Ngoài ra, các đầm/vịnh không được nạo vét nên phân của sinh vật nuôi, thức ăn thừa, xác động vật thủy sinh, xác rong, tảo, các loại hóa chất sử dụng trong quá trình nuôi, các loại vi khuẩn gây bệnh tích tụ ở đáy làm cho nước và bùn đáy trong đầm/vịnh có khuynh hướng ô nhiễm. Các chất hữu cơ tích tụ lại ở đáy đầm/vịnh bị phân hủy kỵ khí sinh ra các sản phẩm như: NH_3 , H_2S , NO_2^- , NO_3^- ... gây hại cho tôm cá và các sinh vật khác sống trong đầm/vịnh. Khi đầm/vịnh có hoạt động nuôi thủy sản bị ô nhiễm sẽ dẫn đến những nhóm vi sinh vật có hại có cơ hội phát triển mạnh, không kiểm soát được và hậu quả là vật nuôi bị bệnh. Nitrate là sản phẩm tiếp theo của quá trình oxy hóa NO_2^- trong chu trình chuyển hóa nitơ, khi hàm lượng NO_2^- vượt quá 10 mg/l sẽ gây nên sự phú dưỡng, ảnh hưởng đến nuôi trồng thủy sản (Boyd, 1998) [1]. Đã có những nghiên cứu vi khuẩn chuyển hóa nitơ từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ, sú trong nước cũng như trên thế giới và tạo ra những sản phẩm sinh học hữu ích cho ao nuôi thủy sản, tuy nhiên việc tuyển chọn nhóm

vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- từ bùn đáy ở vùng nuôi tôm nước mặn hầu như rất ít được nghiên cứu. Xu hướng hiện nay là triển khai các mô hình nuôi tôm hùm trong bể xi măng nhằm kiểm soát được nguồn nước cũng như các dư lượng thuốc sử dụng trong nuôi trồng thủy sản [2]. Vì vậy, việc nghiên cứu xác định các loài vi sinh vật chuyển hóa NO_2^- trong bùn đáy vùng nuôi tôm hùm là hết sức cần thiết, nhằm ứng dụng để sản xuất các chế phẩm sinh học cho xử lý nước trong bể nuôi tôm hùm.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu bùn được thu từ đáy của khu vực 11 lồng nuôi tôm hùm Vịnh Xuân Đài, thị xã Sông Cầu, tỉnh Phú Yên từ tháng 8/2016 đến tháng 7/2017 với độ mặn của nước biển dao động từ 29-35‰, định kỳ 1 tháng/ 1 lần. Các mẫu thu gồm 6 mẫu từ lồng treo ký hiệu lần lượt là T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ và TKT là lồng treo không có nuôi tôm hùm; 5 mẫu từ lồng chìm ký hiệu lần lượt là C₁, C₂, C₃, C₄ và CKT là lồng chìm không có nuôi tôm hùm. Ở mỗi vị trí dưới lồng thu khoảng 100 g bùn được giữ lạnh bằng đá và chuyển về phòng thí nghiệm bảo quản ở 4°C.

Phương pháp phân lập và tăng sinh vi khuẩn chuyển hóa NO_2^-

Môi trường nitrite-calcium-carbonate được sử dụng để phân lập và định lượng vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- dựa trên

*Tác giả liên hệ: Email: hoangtp@hcmuaf.edu.vn

Isolation and selection of nitrite metabolising bacteria from the bottom mud of lobster culture area in Xuan Dai bay, Phu Yen province

Phuoc Thien Hoang Truong*, Huynh Dan Do,
Tran Quoc Thang Vo, Phu Hoa Nguyen

Nong Lam University, Ho Chi Minh city

Received 13 May 2021; accepted 1 July 2021

Abstract:

The study had isolated and selected groups of bacteria that metabolise nitrite from the bottom mud of lobster cages in Xuan Dai bay, Phu Yen province. Analysis results from 21 sludge samples taken from 11 cages of lobster farming area isolated 16 strains of bacteria capable of nitrite metabolism. After investigating biological characteristics and nitrite metabolism of bacteria strains, 10 strains of bacteria were collected with the ability to metabolise nitrite over 95% in 72 hours. In addition, 10 strains of bacteria with the highest NO_2^- treatment efficiency, identified by genetic analysis and looked up on BLAST, defined as *Stenotrophomonas pavanii*, *Chryseobacterium gleum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia lacustris*, *Acinetobacter junii*.

Keywords: lobster cage culture, nitrite, nitrite metabolising bacteria, Xuan Dai bay.

Classification number: 4.6

phương pháp MPN của Ehrlich (1975) [3].

Đếm mật số vi khuẩn theo phương pháp MPN: mẫu bùn được pha loãng ở các nồng độ từ 10^1 - 10^5 với 3 lần lặp, ủ ở 28°C trong 21 ngày. Kiểm tra sự có mặt của NO_2^- ở các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn và đối chứng âm bằng thuốc thử Griess-Ilosway. Tra cứu bảng MPN tiêu chuẩn để xác định số lượng vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- trong 1 g mẫu bùn.

Môi trường Aleem và Alexander (1960) [4] được sử dụng để nuôi tăng sinh vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- .

Đánh giá khả năng chuyển hóa NO_2^- của các chủng vi khuẩn bằng phương pháp trắc quang 4500 NO_2^- -B

Các chủng vi khuẩn sau khi tuyển chọn được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường TSB đạt mật độ 10^7 CFU/ml thì tiến hành các thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý NO_2^- với

3 lần lặp bằng cách hút 1 ml dịch khuẩn (10^7 CFU/ml) cho vào các ống falcon chứa 50 ml môi trường định lượng NO_2^- , các chủng vi khuẩn được nuôi cấy mẻ qua đêm ở 30°C , 150 vòng/phút trong 24 giờ. Mẫu được thu tại thời điểm 12, 24, 36, 48, 60, 72 giờ để phân tích hàm lượng NO_2^- theo phương pháp trắc quang 4500 NO_2^- -B [5, 6]. Sau đó, các kết quả định lượng NO_2^- sẽ được đưa về hiệu suất xử lý theo công thức sau:

$$H = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

trong đó: H là hiệu suất xử lý (%), a là hàm lượng chất ban đầu (mg/l), b là hàm lượng chất sau khoảng thời gian i (mg/l).

Định danh bằng các phản ứng sinh hóa, kit API 20E, API 20NE và phân tích trình tự gen 16S rRNA

Vi khuẩn được nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40 X, vật kính 100 X có giọt dầu. Đồng thời xác định hình dạng tế bào vi khuẩn, nhuộm bào tử, thực hiện các phản ứng oxidase, catalase, kiểm tra di động/bất động, khảo sát nhiệt độ phát triển, khảo sát nồng độ muối vi khuẩn có thể phát triển.

Sử dụng kit API 20E và API 20NE theo hướng dẫn của hãng BioMerieux (Pháp) [7], đọc kết quả dựa vào bảng hướng dẫn và tra phần mềm để xác định tên chi/loài của vi khuẩn thử nghiệm. Sau đó, các chủng vi khuẩn được gửi phân tích trình tự gen 16S rRNA với cặp mồi 27F (5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3') and 515R (5'-TAC CGC GGC TGC TGG CAC-3') [8] tại Công ty TNHH dịch vụ và thương mại Nam Khoa (793/58 Trần Xuân Soạn, P. Tân Hưng, Q.7, TP Hồ Chí Minh).

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý với phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm thống kê MSTATC.

Kết quả và thảo luận

Kết quả khảo sát sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO_2^-

132 mẫu bùn thu từ vịnh Xuân Đài, thị xã Sông Cầu, tỉnh Phú Yên được chuyển vào các ống nghiệm chứa môi trường nitrite-calcium-carbonate, ủ ở 28°C trong 21 ngày, kiểm tra sự hiện diện nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- , kết quả đã chọn lọc được 21 mẫu bùn có hiện diện của nhóm vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO_2^- , trong đó có 10 mẫu bùn có mật số MPN của vi khuẩn nhỏ hơn 10^3 MPN/g và 11 mẫu bùn có mật số MPN lớn hơn 10^3 MPN/g được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Chỉ số Most Probable Number (MPN) của mẫu bùn.

STT	Tên mẫu	Độ pha loãng			Kết quả (MPN/g)
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
1	CKT	3	3	1	4,6x10 ⁴
2	C ₁	3	3	1	4,6x10 ⁴
3	C ₂	3	3	2	1,1x10 ⁵
4	C ₃	3	1	0	4,3x10 ³
5	C ₄	3	3	0	2,4x10 ⁴
6	TKT	2	2	1	2,8x10 ³
7	T ₁	3	1	1	7,5x10 ³
8	T ₂	3	2	0	9,3x10 ³
9	T ₃	2	2	1	2,8x10 ³
10	T ₄	3	1	0	4,3x10 ³
11	T ₅	3	3	1	4,6x10 ⁴

Kết quả bảng 1 cho thấy, nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO₂⁻ (NOB) ở các mẫu bùn nằm trong khoảng 10³ đến 1,1x10⁵ (MPN/g) và hầu như các mẫu bùn ở lồng treo và lồng chìm đều có mật số vi khuẩn từ 10³ MNP/g. Theo nghiên cứu về mật độ nhóm NOB trong đất của một số tác giả như Degrange và Bardin (1995) [9], quần thể NOB nằm trong khoảng 10¹, 10² hoặc 10³ CFU/g. Ngoài ra, Rennie và Schmidt (1977) [10] cho biết mật độ của chúng cao hơn, từ 10³-10⁴ CFU/g. Ở Việt Nam, Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010) [11] cũng nghiên cứu khảo sát về biến động nhóm NOB bằng phương pháp MPN trong ao nuôi tôm sú thâm canh và cho thấy mức dao động từ 5,5 đến 2,6x10³ MPN/g. Hoạt động của NOB giảm ngay sau khi tiếp xúc với ánh nắng mặt trời [12] và NOB trong bùn thấp là do hoạt động và sự phát triển của chúng dễ bị ức chế bởi các yếu tố môi trường như nồng độ NH₃ và pH cao; oxy hòa tan (DO) và NO₂⁻ thấp, nhiệt độ thấp [13]. Ngoài ra, NOB bị giới hạn mạnh bởi cường độ và thời gian chiếu sáng chủ yếu là ánh sáng xanh dương và tím [14]. Trong các ao nuôi thủy sản, NOB được xác định mẫn cảm với ánh sáng nhiều hơn nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB), điều này góp phần làm mất cân bằng quần thể giữa chúng [15]. Kết quả phân tích chỉ số MPN trong nghiên cứu này cho thấy, nhóm NOB tập trung khoảng 10³-10⁵ MPN/g tại vùng đáy vịnh Xuân Đài, khá tương đồng với các nghiên cứu khác ở trong và ngoài nước. Do đó, nghiên cứu tiếp tục phân lập vi khuẩn trên môi trường thạch để chọn lọc nhóm NOB.

Phân lập nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO₂⁻

Những ống nghiệm có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn NOB được tiến hành phân lập trên môi trường thạch nitrite-calcium-carbonate, kết quả thu được 16 chủng vi khuẩn. Sau khi sàng lọc khả năng chuyển hóa NO₂⁻ của các dòng vi khuẩn, chọn được 10 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO₂⁻ cao nhất thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc và nhuộm gram của 10 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO₂⁻ cao nhất.

STT	Ký hiệu chủng vi khuẩn	Khuẩn lạc	Nhuộm Gram	Mô tả
1	CKT			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu vàng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển yếu trên môi trường NaCl 3%.
2	C ₂ /1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu vàng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển yếu trên môi trường NaCl 3%.
3	C ₂ /2			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
4	C ₃ /1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3 và 4,5%, phát triển mạnh ở nhiệt độ 42°C.
5	C ₄ /2			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
6	TKT			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không sinh bào tử, không di động, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
7	T ₁			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3 và 4,5%, phát triển mạnh ở nhiệt độ 42°C.
8	T ₂ /2			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
9	T ₃ /1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
10	T ₄ /1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng trong. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.

Khả năng xử lý NO₂⁻ của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Sau khi chọn lọc nhóm vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO₂⁻ cao nhất, tiến hành khảo sát khả năng xử lý NO₂⁻ của các chủng vi khuẩn. Hiệu suất chuyển hóa NO₂⁻ của 10 chủng vi khuẩn CKT, C₂/1, C₂/2, C₃/1, C₄/2, TKT, T₁, T₂/2, T₃/1, T₄/1 nuôi cấy trong môi trường định lượng nitrite với hàm lượng NO₂⁻ được bổ sung lúc ban đầu là 0,62 mg/l (mật độ vi khuẩn ban đầu là 10⁷CFU/ml) sau 12 h khảo sát được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Hiệu suất chuyển hóa NO₂⁻ của 10 chủng vi khuẩn.

STT	Chủng vi khuẩn	Hiệu suất chuyển hóa NO ₂ ⁻ (%)					
		12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
1	CKT	16,90 ^a ±0,01	34,26 ^d ±0,01	64,87 ^b ±0,03	89,77 ^{bc} ±0,08	94,56 ^{bc} ±0,02	96,62 ^{abc} ±0,01
2	C ₂ /1	9,80 ^f ±0,08	34,64 ^{cd} ±0,46	64,95 ^b ±1,16	87,06 ^{de} ±1,14	96,86 ^{ab} ±0,67	97,99 ^a ±0,58
3	C ₂ /2	15,53 ^d ±0,58	24,67 ^e ±0,27	61,90 ^b ±0,58	87,94 ^{cd} ±0,57	96,16 ^{ab} ±0,57	96,16 ^{abc} ±0,58
4	C ₃ /1	9,52 ^f ±0,06	19,96 ^e ±0,57	56,64 ^e ±0,57	83,10 ^g ±0,46	90,76 ^c ±0,58	95,31 ^{bc} ±0,60
5	C ₄ /2	12,25 ^e ±0,69	26,54 ^d ±0,57	60,34 ^d ±0,66	85,07 ^{cd} ±0,53	91,65 ^{bc} ±0,57	95,15 ^{bc} ±0,57
6	TKT	27,73 ^b ±0,57	35,58 ^{cd} ±1,15	74,86 ^b ±0,57	89,19 ^{bc} ±0,48	93,58 ^{cd} ±0,81	95,73 ^{bc} ±0,58
7	T ₁	13,14 ^e ±0,48	25,59 ^e ±0,21	56,25 ^e ±0,57	82,07 ^e ±0,38	92,90 ^{bc} ±0,27	95,05 ^c ±0,60
8	T ₂ /2	21,39 ^e ±0,68	64,86 ^b ±0,57	80,73 ^b ±1,17	94,76 ^a ±0,58	97,52 ^a ±0,23	98,21 ^a ±0,46
9	T ₃ /1	31,97 ^e ±0,06	36,57 ^e ±0,06	81,19 ^a ±0,05	94,30 ^a ±0,35	96,60 ^{ab} ±0,57	97,29 ^{ab} ±0,23
10	T ₄ /1	17,96 ^d ±0,58	52,52 ^b ±0,06	76,17 ^b ±0,46	91,41 ^b ±0,29	93,91 ^{bc} ±0,57	96,18 ^{abc} ±0,17

Kết quả ở bảng 3 cho thấy khả năng chuyển hóa NO₂⁻ của nhóm vi khuẩn bắt đầu tăng cao sau 36 h. Ở thời điểm 72 h, hiệu suất xử lý của các chủng vi khuẩn đều tăng lên và đạt trên 95%, trong đó chủng vi khuẩn T₂/2 có hiệu suất xử lý cao nhất (98,21%). Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn đã thích nghi và đang hoạt động mạnh. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy ở nghiên cứu của nhóm tác giả Nguyễn Thị Phi Oanh (2019) [16] cho rằng nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO₂⁻ được phân lập tại ao tôm thẻ chân trắng ở Bạc Liêu cho hiệu suất xử lý NO₂⁻ là 97,2% trong thời gian 3 ngày. Do đó, để đánh giá được thời điểm xử lý NO₂⁻ cho mạnh nhất của từng dòng vi khuẩn cần phải tiến hành khảo sát tại các mốc thời gian liên tiếp nhau. Kết quả định lượng NO₂⁻ thấy, khả năng xử lý NO₂⁻ của mỗi chủng vi khuẩn tại các thời điểm khác nhau là có sự khác biệt và tùy thuộc vào môi trường, chủng vi sinh vật. Do vậy, 10 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO₂⁻ cao nhất (với hiệu suất trên 95%) được lựa chọn (CKT, C₂/1, C₂/2, C₃/1, C₄/2, TKT, T₁, T₂/2, T₃/1, T₄/1) để tiến hành định danh sinh hóa và sinh học phân tử.

Định danh vi khuẩn bằng các phản ứng sinh hóa và kit chuẩn đoán API 20E, API 20NE

Sau khi chọn lọc được 10 chủng vi khuẩn có khả năng xử lý NO₂⁻ trên 95% trong thời gian 72 h, tiến hành cho thử nghiệm sinh hóa các chủng vi khuẩn bằng kit API, kết quả được thể hiện ở bảng 4 và bảng 5.

Bảng 4. Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20E.

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn					
	TKT	T ₁	T ₂ /2	C ₂ /2	C ₃ /1	C ₄ /2
ONPG (β-galactosidase)	+	+	+	+	+	+
ADH (arginine dihydrolase)	-	-	-	-	-	-
LDC (lysine decarboxylase)	-	+	-	-	+	-
ODC (ornithine decarboxylase)	-	-	-	-	-	-
CIT (citrate)	+	+	+	+	+	+
H2S (hydrogen sunfite)	-	-	-	-	-	-
URE (enzyme urease)	-	-	-	-	-	-
TDA (enzyme tryptophan deaminase)	-	+	-	-	+	-
IND (indole test)	-	-	-	-	-	-
VP (voges-proskauer)	-	-	-	-	-	-
GEL (enzyme gelatinase)	+	+	+	+	+	+
GLU (lên men glucose)	-	-	-	-	-	-
MAN (D-mannose)	-	-	-	-	-	-
INO (inositol)	-	-	-	-	-	-
SOR (sorbitol)	-	-	-	-	-	-
RHA (rhamnose)	-	-	-	-	-	-
SAC (sucrose)	-	-	-	-	-	-
MEL (melibiose)	-	-	-	-	-	-
AMY (amygdalin)	-	-	-	-	-	-
ARA (arabinose)	-	-	-	-	-	-
OX (oxidase test)	-	+	-	-	+	-

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính.

Bảng 5. Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20NE.

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn			
	T ₃ /1	T ₄ /1	CKT	C ₂ /1
NO ₃ (khử nitrate)	+	-	+	+
TRP (phản ứng indole)	-	-	+	+
GLU (lên men glucose)	-	-	-	-
ADH (arginine dihydrolase)	-	-	-	-
URE (urease)	-	-	+	+
ESC (esculin)	-	-	+	+
GEL (gelatinase)	-	-	+	+
PNG (β-galactosidase)	-	-	+	+
GLU - assim (đồng hóa glucose)	-	-	-	-
ARA (arabinose)	-	-	-	-
MNE (mannose)	-	-	-	-
MAN (D-mannitol)	+	-	-	-
NAG (N-acetyl glucosamine)	-	-	-	-
MAL (D-maltose)	-	-	-	-
GNT (gluconate)	-	-	-	-
CAP (capric acid)	-	+	-	-
ADI (adipic acid)	-	-	-	-
MLT (malic acid)	+	-	-	-
CIT (citrate)	+	+	-	-
PAC (phenyl acetic acid)	+	-	-	-
OX (oxidase)	+	-	+	+

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính.

Kết quả bảng 4 cho thấy, cả 4 chủng vi khuẩn TKT, T₂/2, C₂/2, C₄/2 dương tính với citrate, β-galactosidase, thủy phân gelatin, tra trên phần mềm API 20E V5.0 thì 4 chủng vi khuẩn này có độ tương đồng với chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* là 96,7%. Hai chủng vi khuẩn T₁, C₃/1 dương tính với β-galactosidase, lysine decarboxylase, citrate, enzyme tryptophan deaminase, oxidase, thủy phân gelatin, tra phần mềm API 20E V5.0 cho thấy 2 chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 99,7% với chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia*.

Bảng 5 cho thấy, 2 chủng vi khuẩn CKT và C₂/1 dương tính với phản ứng khử nitrate, phản ứng indole, urease, esculine, thủy phân gelatin, β-galactosidase, oxidase. Tra phần mềm API 20NE V8.0 thấy rằng 2 chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 99,8% với chủng vi khuẩn *Chryseobacterium indologenes*.

Tại bảng 5, hầu hết các phản ứng sinh hóa của chủng vi khuẩn T₃/1 dương tính với phản ứng khử nitrate, phản ứng oxidase, sử dụng cơ chất mannitol, malic acid, citric acid, phenyl acetic acid, tra phần mềm API 20NE V8.0 cho thấy chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 72,5% với chủng vi khuẩn *Delftia acidovorans*. Chủng vi khuẩn T₄/1 đều âm tính, chỉ dương tính với phản ứng citric acid, capric acid. Phần mềm API 20NE V8.0 cho thấy, chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 90,9% với chủng vi khuẩn *Acinetobacter junii/johnsonii*.

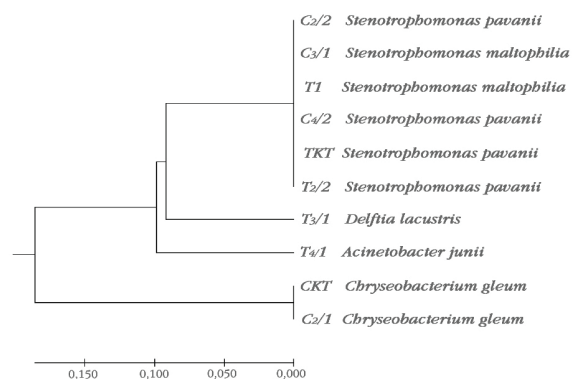
Các chủng vi khuẩn trước khi định danh bằng bộ kit API sẽ được nhuộm gram và thực hiện các phản ứng như oxidase và catalase. Theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ kit API [7] thì nhóm vi khuẩn gram âm và oxidase âm tính thì sử dụng bộ kit API 20E, tuy nhiên trong quá trình thử nghiệm kit API 20E, chủng T₄/1 chỉ cho kết quả chi *Acinetobacter*, do đó tiến hành thử nghiệm trên kit API 20NE để xác định loài. Tương tự, các chủng vi khuẩn gram âm và oxidase dương tính được thử nghiệm trên bộ kit API 20 NE, chủng T1 và C₃/1 cũng cho kết quả là chi *Stenotrophomonas*, do đó tiếp tục tiến hành thử nghiệm trên kit API 20E để xác định loài. Hai chi vi khuẩn *Stenotrophomonas* và *Acinetobacter* có thể dùng cả 2 loại kit API 20E, API 20NE.

Định danh vi khuẩn bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

Sau khi thực hiện phản ứng sinh hóa, tiến hành định danh 10 chủng vi khuẩn có hiệu suất chuyển hóa NO₂⁻ cao nhất (trên 95%) bằng phương pháp giải trình tự gen vùng 16S rDNA, kết quả được thể hiện ở bảng 6 và hình 1.

Bảng 6. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn.

STT	Chủng vi khuẩn	Tên khoa học	Độ tương đồng
1	CKT	<i>Chryseobacterium gleum</i>	99%
2	C ₂ /1	<i>Chryseobacterium gleum</i>	100%
3	C ₂ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%
4	C ₃ /1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%
5	C ₄ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%
6	TKT	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99%
7	T ₁	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%
8	T ₂ /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%
9	T ₃ /1	<i>Delftia lacustris</i>	99%
10	T ₄ /1	<i>Acinetobacter junii</i>	99%



Hình 1. Cây phát sinh loài các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitrite.

Cây phát sinh loài ở hình 1 vẽ theo phương pháp UPGMA (Unweighted PairGroup Method with Arithmetical Averages) bằng phần mềm MEGA 7.2 thể hiện khi ở vùng đoạn gen được giải trình tự hầu như không phát sinh loài có họ hàng gần với các loại đã được định danh, chỉ riêng chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* và *Stenotrophomonas pavanii* có độ tương đồng 100% và kết quả sinh hóa trên kit API cho thấy cả 6 chủng vi khuẩn đều là *Stenotrophomonas maltophilia*, tuy nhiên khi thực hiện nuôi các chủng vi khuẩn trên môi trường có sự hiện diện của muối NaCl 4,5% và ủ vi khuẩn ở nhiệt độ 42°C thì hai chủng vi khuẩn C₃/1 và T₁ mọc trên môi trường thạch đĩa, còn 4 chủng vi khuẩn TKT, T₂/2, C₂/2, C₄/2, không thấy mọc trên môi trường. Tham khảo kết quả nghiên cứu của tác giả Guzik Urszula và cs (2009) [17], Patricia L. Ramos và cs (2011) [18] có thể nhận định chủng vi khuẩn C₃/1 và T₁ là *Stenotrophomonas maltophilia* và các chủng vi khuẩn TKT, T₂/2, C₂/2, C₄/2 là *Stenotrophomonas pavanii*.

Dựa vào kết quả giải trình tự gen 16S rRNA, có thể nhận định chủng vi khuẩn CKT và C₂/1 là *Chryseobacterium gleum*, chủng T₃/1 là *Delftia lacustris*, chủng ký hiệu T₄/1 là *Acinetobacter junii*.

Theo tác giả Phạm Thị Tuyết Ngân và cs (2011) [6], *Nitrosomonas nitrosa* và *Nitrobacter winogradskyi* là 2 loài vi khuẩn nitrite hóa hiện diện trong ao nuôi tôm sú thâm canh, phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác là nhóm vi khuẩn NO₂⁻ bao gồm 5 giống khác nhau: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosobrio*, *Nitrozolobus* và *Nitrospira* [19-21]. Tuy nhiên, theo kết quả định danh sinh học phân tử trong nghiên cứu này đã xác định được các loài vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii*, *Chryseobacterium gleum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia lacustris*, *Acinetobacter junii* là các dòng chuyển hóa NO₂⁻ trong môi trường nước mặn được phân lập từ bùn đáy ở vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. Nguyên nhân của kết quả trên có thể là do độ mặn của nước biển và thức ăn tươi cho tôm hùm làm ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật chuyển hóa NO₂⁻ trong nước mặn và nhóm vi khuẩn được phân lập, định danh có kết quả khác với một số nghiên cứu phân lập vi khuẩn chuyển hóa NO₂⁻

trong ao tôm thẻ chân trắng hay tôm sú. Hiện nay, những nghiên cứu về nhóm vi sinh vật chuyển hóa NO_2^- trong bùn nuôi tôm hùm còn rất hạn chế, các loài vi khuẩn được xác định trong nghiên cứu này vẫn chưa được đề cập đến việc chuyển hóa NO_2^- trong nuôi trồng thủy sản, tuy nhiên có một số nghiên cứu trên thế giới đã minh chứng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. có khả năng chuyển hóa NO_2^- trong bùn của nước thải xử lý thực vật [22], chủng vi khuẩn *Delftia lacustris* có khả năng phân hủy chất peptidoglycan trong tự nhiên [23], chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* có khả năng sử dụng các hợp chất thơm [17], chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* phân lập từ thân của một giống mía ở Brazil có khả năng cố định nitơ [18], chủng vi khuẩn *Chryseobacterium gleum* phân hủy dầu mỏ tại các vùng đất nhiễm xăng dầu [24]. Trong các chủng vi khuẩn được định danh thì chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* có khả năng xử lý các hợp chất chứa nitơ như ammonia, NO_2^- nhưng đây cũng là một chủng vi khuẩn gây nhiễm khuẩn cơ hội cho con người tại các bệnh viện. Vì vậy cần đặc biệt lưu ý và có biện pháp kiểm soát khi tiến hành sử dụng chủng vi khuẩn này trong các nghiên cứu sau.

KẾT LUẬN

Đã phân lập, tuyển chọn và định danh được 5 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO_2^- ở vùng bùn đáy lồng bè nuôi tôm hùm vịnh Xuân Đài, Phú Yên. Đó là các loài vi khuẩn như *Stenotrophomonas pavanii*, *Chryseobacterium gleum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia lacustris*, *Acinetobacter junii*. Trong đó, chủng *Stenotrophomonas pavanii* có khả năng chuyển hóa NO_2^- cao nhất trong thời gian 72 h với hiệu suất 98,21%, kế đến là chủng vi khuẩn *Chryseobacterium gleum*, *Delftia lacustris* có khả năng chuyển hóa NO_2^- với hiệu suất 97,99% và 97,29%. Có thể ứng dụng các chủng vi khuẩn này vào sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng xử lý NO_2^- trong nuôi trồng thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hoàn thành là một phần kết quả nghiên cứu của đề tài độc lập cấp nhà nước mã số ĐTĐL.CNN-60/15. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C.E. Boyd (1998), *Water Quality for Pond Aquaculture*, Auburn University.

[2] Nguyễn Hữu Hào, Trần Văn Vinh, Nguyễn Duy Lâm, Nguyễn Hải Bình, Lê Văn Hùng, Huỳnh Văn Cảnh (2010), *Nghiên cứu đề xuất giải pháp khai thác bền vững nguồn lợi tôm hùm giống tỉnh Bình Định*, Chi cục Bảo vệ nguồn lợi thủy sản Bình Định.

[3] G.G. Ehrlich (1975), "Water quality: analytical methods - nitrifying bacteria (most probable number, MPN, method)", *R. J. Pickering*, **75**, p.13.

[4] M.I. Aleem, M. Alexander (1960), "Nutrition and physiology of *Nitrobacter agilis*", *Applied and Environmental Microbiology*, **8(2)**, pp.80-84.

[5] APHA (2012), *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*.

[6] Phạm Thị Tuyết Ngân, Trần Nhân Dũng và Dương Minh Viễn (2011), "Khảo sát mật độ và sự đa dạng của vi khuẩn nitrate hóa trong ao nuôi tôm", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **20b**, tr.69-78.

chi Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, **20b**, tr.69-78.

[7] The Global Health Network (2013), *Bacterial Identification Using BioMerieux API Kits*.

[8] Tim Schuurman, Richard F. de Boer, Anna M.D. Kooistra-Smid, and Anton A. van Zwet (2004), "Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16s ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting", *Journal of Clinical Microbiology*, **42(2)**, pp.734-741.

[9] V. Degrange, R. Bardin (1995), "Detection and counting of *Nitrobacter* population in soil by PCR", *Applied and Environmental Microbiology*, **61(6)**, pp.2093-2098.

[10] R.J. Rennie, E.L. Schmidt (1977), "Immunofluorescence studies nitrobacter population in soils", *Can. J. Microbiol.*, **23**, pp.1011-1017.

[11] Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010), "Biến động mật độ vi khuẩn hữu ích trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) thâm canh", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **14**, tr.166-176.

[12] A. Vanzella, M.A. Gurreno, R.D. Jones (1985), "Effects of CO_2 light on ammonium and nitrite oxidation by chemolithotrophic bacteria", *Mar. Ecol.-Pcol. Ser.*, **57**, pp.69-76.

[13] B. Balmelle (1992), "Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification", *Water Sci. Technol.*, **26**, pp.1018-1025.

[14] R.J. Olson (1981), "Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum", *J. Mar. Res.*, **39**, pp.227-238.

[15] T. Yoshioka, Y. Saijo (1984), "Photoinhibition and recovery of NH_4^+ - oxidizing bacteria and NO_2^- oxidizing bacteria", *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**, pp.151-166.

[16] Nguyễn Thị Phi Oanh, 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)**, tr.75-81.

[17] Guzik Urszula, Gre Izabela, Wojcieszka Ska Danuta, Abu Ek Sylwia (2009), "Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation", *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**, pp.285-291.

[18] Patricia L. Ramos, Stefanie Van Trappen, Fabiano L. Thompson, Rafael S. Rocha, Heloiza R. Barbosa, Paul De Vos and Carlos A. Moreira-Filho (2011), "Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp.nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**, pp.926-931.

[19] E. Bock and H.P. Koops (1992), "The genus nitrobacter and related genera in balows, truper, dsorkin, harder and schleifer", *A Handbook on the Biology of Bacteria*, **3**, pp.2302-2309.

[20] R.A. Herbert (1999), "Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems", *FEMS Microbiology Reviews*, **23**, pp.563-590.

[21] W.S. Waston, E. Book, H. Harms, H. Koops and A.B. Hooper (1989), "Nitrite - oxidizing bacteria", *Begrey's Manul of Systematic Bacteriology*, **3**, pp.1810-1815.

[22] Bin Li, Ran Lv, Ying Xiao, Wei Hu, Yuliang Mai, Jingwen Zhang, Lan Lin, Xiaoyong Hu (2019), "A novel nitrite-base aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter* sp. YT03 and its transcriptome analysis", *Frontiers in Microbiology*, **10**, pp.1-13.

[23] Niels O.G. Jørgensen, Kristian K. Brandt, Ole Nybroe1, Michael Hansen (2009), "*Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycandegrading bacterium from fresh water and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycandegrading bacterium", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**, pp.2195-2199.

[24] Đinh Thị Vân, Ngô Cao Cường (2018), "Phân lập, định danh và nghiên cứu đặc điểm sinh học một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu mỏ trong mẫu đất, bùn nhiễm xăng dầu tại Quận khu 7", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **61(6)**, tr.24-28.