

DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.170

PHÂN LẬP VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG CHUYỂN HÓA NITRITE TRONG MỘT SỐ AO NUÔI TÔM Ở BẠC LIÊU

Nguyễn Thị Phi Oanh*¹ và Nguyễn Thị Trúc Mai²

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên ngành Sinh học Khóa 41, Khoa Khoa học Tự nhiên

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Phi Oanh (email: ntpoanh@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

In the nitrogen cycle, nitrite is produced by the biological oxidation of ammonium under aerobic condition. Ammonium accumulated in aquaculture ponds due to feed leftovers and wastes is oxidized to nitrite by bacteria. Increased concentration of nitrite in ponds poses toxic effects to fish, shrimp resulting in low yield and quality. This study aimed at isolation and screen for indigenous bacteria capable of effectively transforming nitrite. Sixteen bacterial isolates were isolated from water and sediment samples collected in shrimp ponds in Bac Lieu. These isolates grew in liquid minimal salt medium supplemented with NaNO₂ as the only nitrogen source. The data showed that isolates BLS1.3, BLW2.2 and BLW2.4 were able to transform nitrite with higher efficiency than the others (>56.3%) after 7 days of incubation. Among the three isolates, BLW2.2 was the most potential one for the conversion of nitrite, obtaining 97.2% after 3 days of inoculation.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/08/2019

Ngày nhận bài sửa: 27/08/2019

Ngày duyệt đăng: 26/12/2019

Title:

Isolation of nitrite transforming bacteria in shrimp ponds in Bac Lieu

Từ khóa:

Ao nuôi thủy sản, phân lập, phương pháp Griess, vi khuẩn chuyển hóa nitrite

Keywords:

Aquaculture ponds, Griess method, isolation, nitrite transforming bacteria

TÓM TẮT

Trong chu trình nitơ, nitrite được sinh ra từ sự oxy hóa sinh học ammonium trong điều kiện hiếu khí. Ammonium hiện diện trong ao nuôi thủy sản có nguồn gốc từ thức ăn thừa và từ chất thải của tôm, cá được vi khuẩn trong nước chuyển hóa thành nitrite. Nitrite tích tụ trong ao nuôi sẽ gây độc cho tôm, cá từ đó ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng sản phẩm thủy sản. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng chuyển hóa nitrite hiệu quả. Mười sáu dòng vi khuẩn phát triển trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung NaNO₂ đã được phân lập từ mẫu nước và mẫu bùn thu tại các ao nuôi tôm ở Bạc Liêu. Kết quả khảo sát cho thấy ba dòng vi khuẩn gồm BLS1.3, BLW2.2 và BLW2.4 có khả năng chuyển hóa nitrite cao hơn so với các dòng còn lại, đạt trên 56,3% sau bảy ngày nuôi cấy, trong đó dòng vi khuẩn BLW2.2 có hiệu suất chuyển hóa nitrite cao nhất, đạt 97,2% sau ba ngày nuôi cấy.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Phi Oanh và 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): 75-81.

1 GIỚI THIỆU

Trong chu trình nitơ tự nhiên, nitrite là sản phẩm trung gian của quá trình nitrate hóa. Trong giai đoạn đầu của quá trình nitrate hóa, vi khuẩn chuyển hóa ammonium thành nitrite. Nguồn

ammonium hiện diện trong các ao nuôi thủy sản có nguồn gốc từ xác chết của động vật thủy sinh bị phân hủy, tuy nhiên, phần lớn ammonium được sinh ra từ thức ăn thừa và chất bài tiết của tôm, cá. Trong ao nuôi tôm, chỉ 24 - 37% nitơ và 11 - 20%

phospho trong thức ăn được chuyển hóa thành sinh khối tôm, chất dinh dưỡng còn lại tồn tại trong thức ăn thừa và trong chất thải. Hàm lượng nitơ còn thừa trong nước ao nuôi là nguyên nhân gia tăng các hợp chất có hại cho thủy sản như ammonium và nitrite (Funge-Smith and Briggs, 1998; Sahu *et al.*, 2013). Ngoài ra, nitrite còn được tích lũy trong ao nuôi do hoạt động của vi khuẩn khử nitrate (Lê Văn Cát, 2007). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự tích tụ nitrite sẽ gây độc cho động vật thủy sinh. Ví dụ, cá ba sa khi hấp thu nitrite bị bệnh máu nâu dẫn đến ngạt do thiếu oxy trong máu (Nguyễn Thị Kim Hà và *ctv.*, 2017). Tôm, cá bị nhiễm nitrite chậm phát triển, thậm chí có thể chết (Jensen, 2003). Do vậy, nitrite được xem là chỉ tiêu để đánh giá chất lượng nước, đặc biệt, trong các ao nuôi thủy sản thâm canh, nồng độ nitrite rất được quan tâm.

Hiện nay, sử dụng vi sinh vật để xử lý các chất gây ô nhiễm môi trường đã và đang được ứng dụng rộng rãi do phương pháp sinh học bền vững và thân thiện với môi trường. Nhiều nhóm vi khuẩn Gram âm cũng đã được chứng minh có khả năng oxy hóa nitrite. Theo Ma *et al.* (2014), năm nhóm vi khuẩn gồm *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira* và nhóm mới *Candidatus Nitrotoga* có khả năng oxy hóa nitrite thành nitrate.

Đồng bằng Sông Cửu Long có diện tích nuôi trồng thủy sản rất lớn, đáp ứng nhu cầu thực phẩm cho người dân đồng bằng và xuất khẩu. Một số nghiên cứu về vi khuẩn chuyển hóa đạm trong ao nuôi tôm cũng đã được thực hiện. Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010) nghiên cứu về biến động mật số vi khuẩn hữu ích trong ao nuôi tôm sú thâm canh, khảo sát mật độ và sự đa dạng của vi khuẩn nitrate hóa trong ao nuôi tôm (Phạm Thị Tuyết Ngân và *ctv.*, 2011) hay nghiên cứu về quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú (Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012). Tuy nhiên, nghiên cứu về phân lập vi khuẩn bản địa có khả năng chuyển hóa nitrite trong các ao nuôi thủy sản ở Đồng bằng Sông Cửu Long chưa được công bố. Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa nitrite trong một số ao nuôi tôm ở Bạc Liêu nhằm tìm ra các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng chuyển hóa hiệu quả hợp chất này.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thu mẫu

Mẫu nước và mẫu bùn được thu ở 3 ao nuôi tôm thẻ chân trắng công nghiệp ở Bạc Liêu. Tại mỗi ao nuôi, 3 mẫu nước mặt và 3 mẫu bùn được thu dọc theo một cạnh của ao gồm đầu ao, giữa ao

và cuối ao. Các mẫu nước và mẫu bùn được lần lượt trộn đều và lấy một mẫu nước và một mẫu bùn đại diện cho từng ao nuôi. Các mẫu sau khi thu được bảo quản lạnh và sử dụng ngay để phân lập vi khuẩn.

2.2 Phân lập vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite

Cho 10 mL mẫu nước hoặc 5 g mẫu bùn vào các bình tam giác có chứa sẵn 50 mL môi trường khoáng tối thiểu và có bổ sung NaNO_2 0,2 g/L đã được khử trùng. Thành phần hóa chất cho 1000 mL môi trường khoáng tối thiểu gồm 1,4196 g Na_2HPO_4 ; 1,3609 g KH_2PO_4 ; 0,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,0985 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,75 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,75 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,7 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,16 mg H_3BO_3 ; 1,15 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,24 mg CuSO_4 ; 3,2 mg Na_2EDTA ; 0,235 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,125 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1000 mL H_2O ; $\text{pH}=7 \pm 0,2$ (Breugelmans, 2005). Mẫu được lắc trên máy lắc ngang với tốc độ 150 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm trong một tuần. Sau đó, mẫu được để lắng 30 phút, hút 5 mL huyền phù phía trên và chuyển sang bình tam giác mới có chứa 50 mL môi trường tương tự, tiếp tục lắc mẫu trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 1 tuần (giai đoạn này được lặp lại 2 lần). Sau 2 lần cấy chuyển, mẫu được để yên trong 30 phút. Hút 100 μL huyền phù phía trên và trải lên môi trường khoáng tối thiểu đặc có bổ sung NaNO_2 0,2 g/L. Dùng bi thủy tinh trải vi khuẩn phân bố đều khắp mặt đĩa. Vi khuẩn được ủ ở 32°C trong 72 giờ. Khi vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc, chọn các khuẩn lạc rời rạc có đặc điểm hình thái khác nhau và cấy chuyển nhiều lần sang môi trường cùng loại cho đến khi chọn được các khuẩn lạc đồng nhất về hình thái và đều nhau trên đường cấy. Sau đó, cấy chuyển khuẩn lạc sang môi trường TSA (30g/L Trypticase soy broth và 15g/L agar) và ủ ở 32°C trong 48 giờ để kiểm tra độ thuần của vi khuẩn phân lập.

2.3 Xác định nồng độ nitrite tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn

Chung một khuẩn lạc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA của từng dòng vi khuẩn vào môi trường TSB (30 g/L) và lắc trên máy lắc ngang với tốc độ 150 vòng/phút qua đêm. Mật độ quang của các dòng vi khuẩn được điều chỉnh về cùng giá trị $\text{OD}_{640\text{nm}} = 0,8$. Sau đó, chủng 100 μL huyền phù của từng dòng khuẩn vào ống nghiệm có chứa 8 mL môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung NaNO_2 với các nồng độ là 37,5 mg/L; 75 mg/L và 150 mg/L. Nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Mẫu được lắc trên máy lắc ngang với tốc độ 150 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Nồng

độ nitrite còn lại trong môi trường được định lượng ở thời điểm 7 ngày nuôi cấy.

Nitrite được định lượng bằng phương pháp Griess dựa vào phản ứng giữa nitrite với sulfanilamide và naphthylendiamine tạo phức màu hồng. Phức màu của hỗn hợp từ hồng nhạt đến hồng đậm tương ứng với nồng độ nitrite trong mẫu từ thấp tới cao. Độ hấp thụ quang của hỗn hợp được xác định ở bước sóng 540 nm (APHA, 2001) bằng máy đo quang phổ UV-Vis Multiscan Go, Thermo Scientific.

2.4 Khả năng chuyển hóa nitrite của các dòng vi khuẩn phân lập

Chung một khuẩn lạc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA của từng dòng vi khuẩn vào môi trường TSB và lắc trên máy lắc ngang với tốc độ 150 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm và nuôi cấy qua đêm. Mật độ quang của các dòng vi khuẩn được điều chỉnh về cùng giá trị OD_{640nm} = 0,8. Sau đó, chủng 100 µL huyền phù của từng dòng khuẩn vào ống nghiệm có chứa 8 mL môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung NaNO₂ (nồng độ nitrite bổ sung là nồng độ nitrite tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn dựa vào kết quả thí nghiệm ở Mục 2.3). Nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Mẫu được lắc trên máy lắc ngang 150 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Hàm lượng nitrite còn lại trong môi trường được định lượng sau 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy.

2.5 So sánh khả năng chuyển hóa nitrite của các dòng vi khuẩn tiềm năng

Các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite hiệu quả được tuyển chọn để so sánh hiệu quả chuyển hóa nitrite của chúng. Thí nghiệm được thực hiện tương tự như mô tả ở Mục 2.4. Các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite cao được ghi nhận các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và nhuộm Gram (Coico, 2005).

Phương pháp phân tích số liệu: Các số liệu được xử lý, vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và được thống kê bằng phần mềm Minitab 16.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite

Từ 3 mẫu nước và 3 mẫu bùn được thu ở 3 ao nuôi tôm ở Bạc Liêu, 16 dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung NaNO₂ đã được phân lập từ 2 mẫu nước (10 dòng) và 1 mẫu bùn (6 dòng) chứng tỏ vi khuẩn chuyển

hóa nitrite hiện diện trong nước và trong bùn đáy ao nuôi tôm. Tuy nhiên, trong 1 mẫu nước và 2 mẫu bùn còn lại, chưa phân lập được các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite (Bảng 1), điều này có thể do trong quá trình cấy chuyển huyền phù vi khuẩn khi phân lập, chưa chuyển được các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite. Về đặc điểm hình thái, khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân lập có hình tròn hoặc không đều, trượt; màu trắng hoặc trắng ngà; bia nguyên hoặc chia thùy; độ nổi lồi hoặc mô; không nhầy, đường kính khuẩn lạc biến thiên từ 2 - 11 mm sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA.

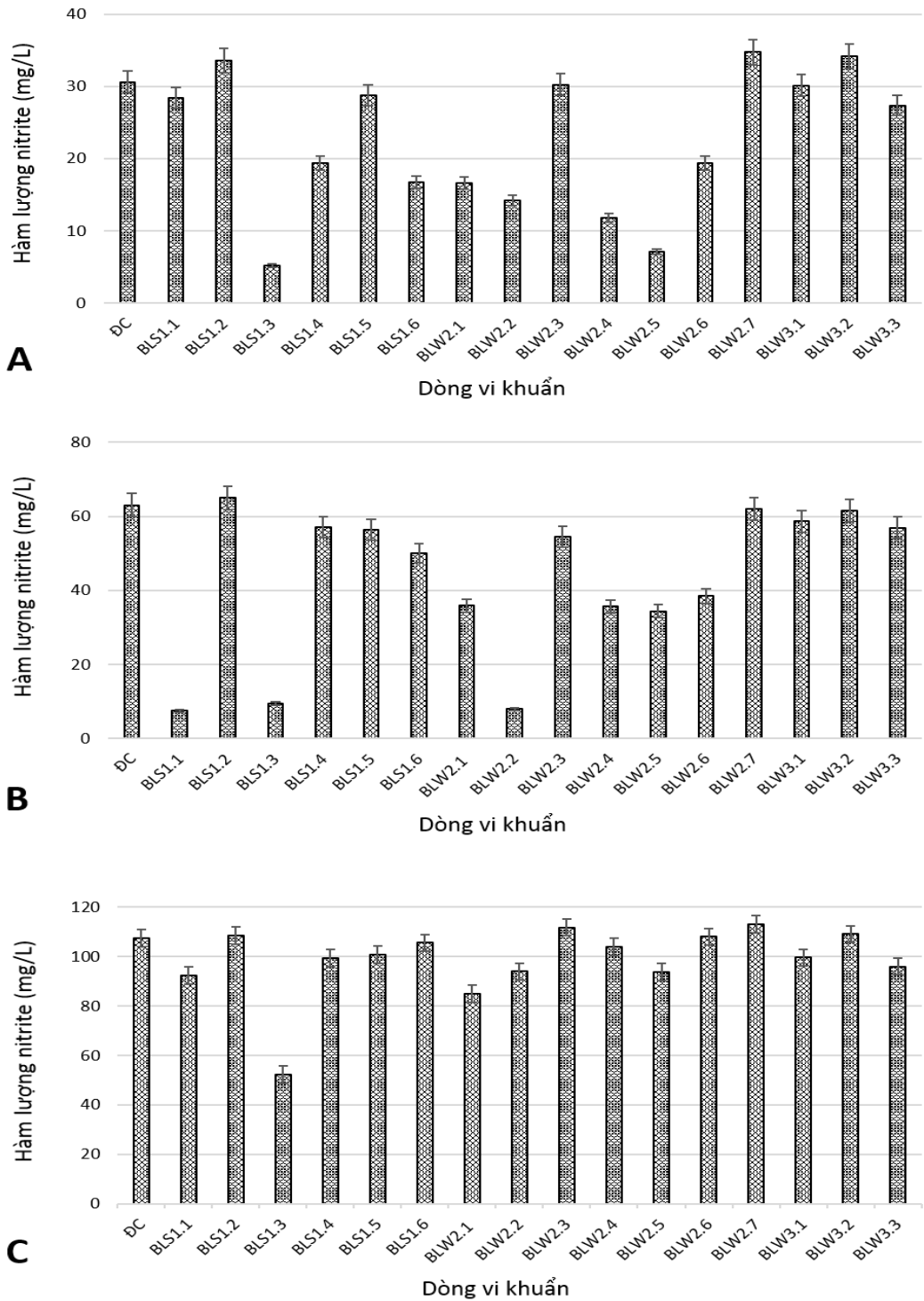
Bảng 1: Số lượng các dòng vi khuẩn được phân lập

Ao nuôi	Mẫu	Ký hiệu mẫu	Số dòng vi khuẩn
1	Nước	BLW1	-
	Bùn	BLS1	6
2	Nước	BLW2	7
	Bùn	BLS2	-
3	Nước	BLW3	3
	Bùn	BLS3	-

-: chưa phân lập được vi khuẩn

3.2 Nồng độ nitrite tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn

Để xác định nồng độ nitrite tối ưu cho sự phát triển của 16 dòng vi khuẩn phân lập, môi trường nuôi cấy vi khuẩn được bổ sung nitrite với các nồng độ NaNO₂ lần lượt là 37,5 mg/L, 75 mg/L và 150 mg/L. Hàm lượng nitrite còn lại trong môi trường được xác định ở thời điểm 7 ngày nuôi cấy. Với nồng độ NaNO₂ bổ sung là 37,5 mg/L, 6 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite trên 50% gồm BLS1.3, BLS1.6, BLW2.1, BLW2.2, BLW2.4 và BLW2.5 (Hình 1A). Ở nồng độ 75 mg/L NaNO₂, 3 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite trên 50% gồm BLS1.1, BLS1.3 và BLW2.2. Hầu hết các dòng vi khuẩn còn lại có hiệu suất chuyển hóa nitrite thấp (Hình 1B). Với nồng độ NaNO₂ là 150 mg/L, sau 7 ngày khảo sát, đa số các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite thấp, chỉ có dòng vi khuẩn BLS1.3 có hiệu suất chuyển hóa nitrite hơn 50% (Hình 1C). Vì vậy, nồng độ NaNO₂ 150 mg/L không thích hợp cho sự chuyển hóa nitrite của các dòng vi khuẩn phân lập. Trong 3 nồng độ NaNO₂ khảo sát, số lượng dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NaNO₂ tương đối cao khi môi trường nuôi cấy được bổ sung 37,5 mg/L NaNO₂. Vì vậy, nồng độ này được chọn để khảo sát khả năng chuyển hóa nitrite của vi khuẩn trong các thí nghiệm tiếp theo.



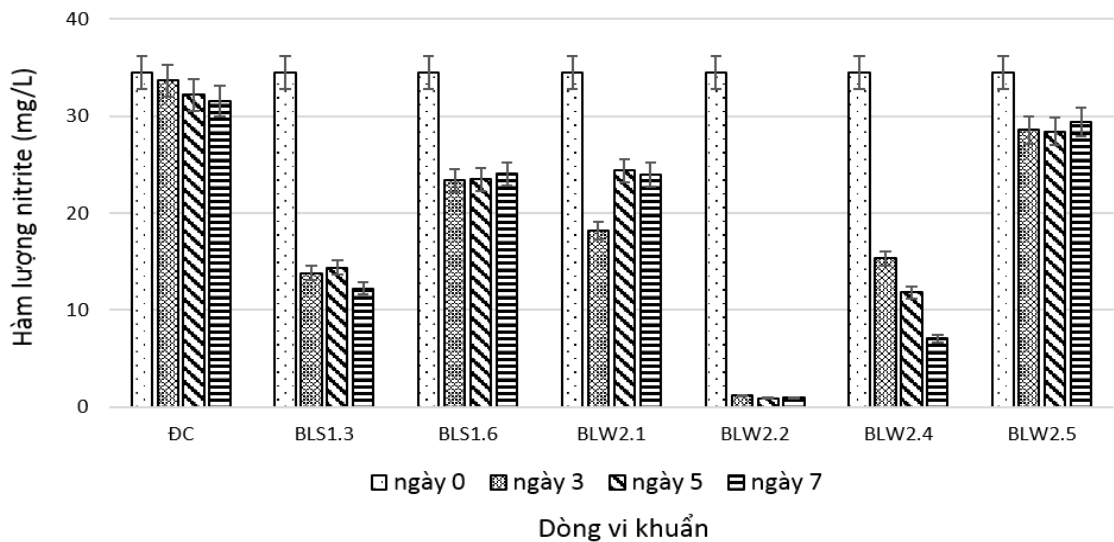
Hình 1: Hàm lượng nitrite còn lại sau 7 ngày nuôi cấy vi khuẩn khi được bổ sung các nồng độ NaNO₂ khác nhau

A: 37,5 mg/L NaNO₂; B: 75 mg/L NaNO₂; C: 150 mg/L NaNO₂. ĐC: đối chứng

Khi được chủng vào môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 37,5 mg/L NaNO₂, các dòng vi khuẩn có khả năng sử dụng nitrite như nguồn nitơ tăng trưởng và tạo sinh khối làm đục môi trường, điều này được chứng minh qua sự giảm lượng nitrite theo thời gian nuôi cấy. Kết quả phân tích cho thấy 6/16 dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite với hiệu suất trên 50% sau 7 ngày gồm các dòng BLS1.3, BLS1.6, BLW2.1, BLW2.2, BLW2.4 và BLW2.5 (Hình 1A). Trong đó, sự chuyển hóa nitrite ở các dòng BLS1.3, BLW2.1, BLW2.2 và BLW2.4 không ổn định, có sự tăng nhẹ hàm lượng nitrite ở thời điểm 5 và 7 ngày, điều này có thể do quá trình phản nitrate hóa diễn ra ở chu trình nitơ trong nước (Lê Văn Cát, 2007). Vì vậy, 6 dòng vi khuẩn BLS1.3, BLS1.6, BLW2.1; BLW2.2, BLW2.4 và BLW2.5 được chọn để so sánh khả năng chuyển hóa nitrite của chúng.

3.3 Khả năng chuyển hóa nitrite của các dòng vi khuẩn tiềm năng

Khảo sát khả năng chuyển hóa nitrite của 6 dòng vi khuẩn BLS1.3, BLS1.6, BLW2.1, BLW2.2, BLW2.4 và BLW2.5 cho thấy 3 dòng vi khuẩn gồm BLS1.3 được phân lập từ mẫu bùn, BLW2.2 và BLW2.4 được phân lập từ mẫu nước có khả năng chuyển hóa cao nhất (Hình 2). Sau 3 ngày nuôi cấy, dòng BLW2.2, BLS1.3 và BLW2.4 có hiệu suất chuyển hóa nitrite lần lượt là 96,5%; 59,9% và 55,6%. Sau 7 ngày nuôi cấy, dòng BLW2.2 chuyển hóa nitrite cao nhất, đạt 97,2% trong khi 2 dòng BLW2.4 và BLS1.3 chuyển hóa được 79,6% và 56,3% nitrite. Kết quả phân tích thống kê cho thấy hiệu suất chuyển hóa nitrite của dòng vi khuẩn BLW2.2 cao nhất, khác biệt so với hai dòng còn lại và so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$) (Hình 3). Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của ba dòng vi khuẩn BLS1.3, BLW2.2 và BLW2.4 được trình bày trong Bảng 2, hình dạng khuẩn lạc của vi khuẩn được minh họa ở Hình 4.

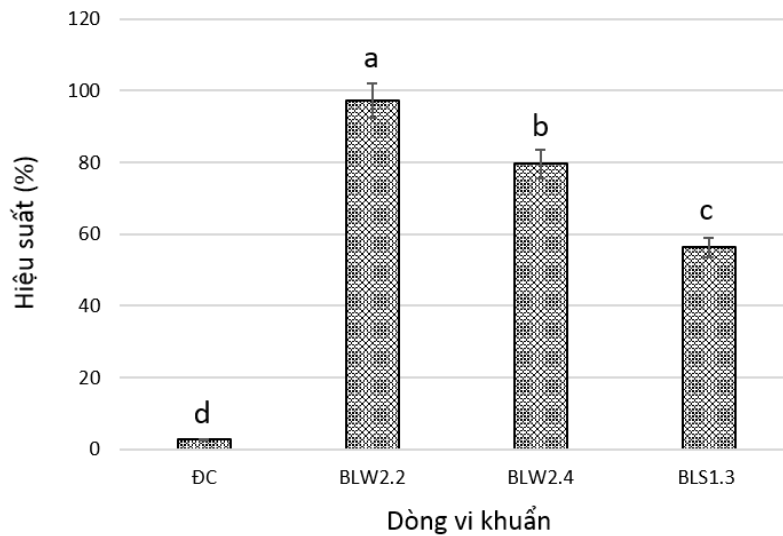


Hình 2: Sự thay đổi nồng độ nitrite theo thời gian của sáu dòng vi khuẩn

ĐC: đối chứng

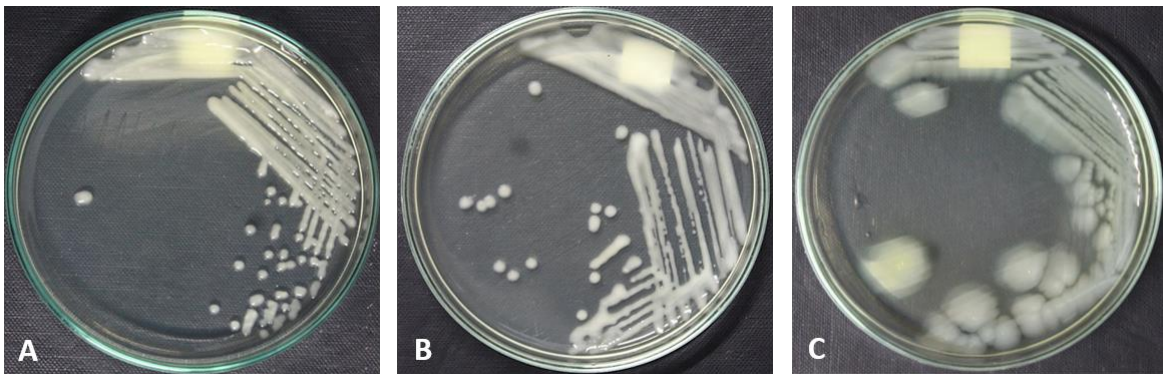
Bảng 2: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn chuyển hóa nitrite hiệu quả

TT Dòng	Khuẩn lạc						Tế bào	
	Hình dạng	Màu sắc	Bìa	Độ nổi	Nhảy	Đường kính (mm)	Hình dạng	Gram
1 BLS1.3	tròn	trắng ngà	nguyên	mô	nhảy	2	que	âm
2 BLW2.2	tròn	trắng ngà	nguyên	mô	không	2	que	âm
3 BLW2.4	không đều, trượt	trắng	có thùy	lài	không	8	que	âm



Hình 3: Hiệu suất chuyển hóa nitrite của 3 dòng vi khuẩn tiềm năng sau 7 ngày

ĐC: đối chứng. Các giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 4: Hình thái của các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite hiệu quả

A: dòng BLS1.3; B: dòng BLW2.2; C: dòng BLW2.4

Theo Ngô Thị Kim Toán (2012), 3 dòng vi khuẩn B21.10, B23.2 và B21.1 được phân lập từ nước thải của bể biogas ở Vĩnh Lộc, Thanh Hóa có hiệu suất chuyển hóa nitrite (80 mg/L) sau 5 ngày tương ứng là 75,23%; 69,07% và 7,26%. Các dòng vi khuẩn NB1, NB2 và NB5 được phân lập từ bùn thải của bể xử lý sinh học thuộc khu liên hợp xử lý chất thải Nam Bình Dương có khả năng chuyển hóa nitrite (2 g/L) với hiệu suất tương ứng là 99,85%; 97,15% và 98,44% sau 24 giờ (Trần Ngọc Hùng và Huỳnh Thị Kim Trang, 2017). Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn BLW2.2 có khả năng chuyển hóa 96,5% nitrite với nồng độ là 37,5 mg/L NaNO_2 sau 3 ngày nuôi cấy. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng chuyển hóa nitrite các dòng vi khuẩn được phân lập từ các môi trường

khác nhau sẽ không giống nhau, tùy thuộc vào giống, loài vi khuẩn và môi trường sống của chúng.

4 KẾT LUẬN

Ba dòng vi khuẩn BLW2.2, BLS1.3 và BLW2.4 được phân lập từ các ao nuôi tôm có khả năng chuyển hóa nitrite cao với hiệu suất chuyển hóa nitrite lần lượt là 96,5%, 59,9% và 55,6% sau 3 ngày nuôi cấy và 97,2%; 56,3% và 79,6% sau 7 ngày nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

APHA, American Public Health Association, 2001. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed., American Public Health Association, Washington DC.

- Breugelmans, P., 2005. Protocol for media preparation. In: Protocol: Media preparation. Division Soil and Water Management, KULeuven, Belgium.
- Coico, R., 2005. Gram staining. Current Protocols in Microbiology Appendix 3: Appendix 3C. doi: 10.1002/9780471729259.mca03cs00.
- Funge-Smith, S.J. and Briggs, M.R.P., 1998. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture*. 164(1): 117-133.
- Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 135(1): 9-24.
- Lê Văn Cát, 2007. Xử lý nước thải giàu hợp chất nitơ và photpho. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Hà Nội. 653 trang.
- Ma, S., Zhang, D., Zhang W., and Wang Y., 2014. Ammonia stimulates growth and nitrite-oxidizing activity of *Nitrobacter winogradskyi*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 28(1): 27-32.
- Ngô Thị Kim Toán, 2012. Nghiên cứu phân lập tuyển chọn các chủng vi sinh vật ứng dụng xử lý nước thải giàu nitơ, photpho. Luận văn thạc sĩ khoa học. Đại học Quốc gia Hà Nội. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
- Nguyễn Thị Kim Hà, Nguyễn Trần Phương Thảo, Trần Thị Phương Hằng, Nguyễn Thanh Phương, Mark Bayley và Đỗ Thị Thanh Hương, 2017. Ảnh hưởng của nitrite lên một số chỉ tiêu sinh lý và tăng trưởng của cá ba sa (*Pangasius bocourti*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 52: 93-102.
- 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: 166-176.
- 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: 69-78.
- Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012. Nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*). Luận án tiến sĩ thủy sản. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Sahu, B.C., Adhikari S., and Dey L., 2013. Carbon, nitrogen and phosphorus budget in shrimp (*Penaeus monodon*) culture ponds in eastern India. *Aquaculture International*. 21(2): 453-466.
- Trần Ngọc Hùng và Huỳnh Thị Kim Trang, 2017. Phân lập và thử nghiệm khả năng xử lý nitrite trong nước rỉ rác của vi khuẩn *Nitrobacter* sp. *Tạp chí khoa học Đại học Thủ Dầu Một*. 3(34): 55-61.