Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên
website: ctujsvn.ctu.edu.vn

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.140

PHÂN LẬP VI KHUẨN TRONG NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN THỦY SẢN CÓ KHẢ NĂNG HẤP THU NITRITE

Trương Vũ Luân[1,2], Phạm Công Phú[1,2], Phạm Thảo Trang[2], Võ Phát Tài[3] và Nguyễn Thị Phi Oanh[3*]

[1]*Học viên ngành Công nghệ Sinh học khóa 28, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ*

[2]*Sinh viên ngành Sinh học khóa 43, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ*

[3]*Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ*

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

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 23/05/2022
Ngày nhận bài sửa: 16/06/2022
Ngày duyệt đăng: 07/07/2022

Title:
Isolation of nitrite uptaking bacteria from seafood processing wastewater

Từ khóa:
Hấp thu nitrite, nước thải chế biến thủy sản, phân lập, vi khuẩn

Keywords:
Bacteria, isolation, nitrite uptake, seafood processing wastewater

ABSTRACT

Seafood processing wastewater contains several nitrogen sources including ammonium, nitrite and nitrate with high concentration. In water bodies, high level of nitrite can cause toxic effects to aquatic organisms, contaminate water sources and affect human health. From water and surface sediment samples collected in shrimp processing wastewater, 37 bacterial strains capable of nitrite uptake were isolated, in which 24 strains were obtained from the water sample and 13 strains were isolated from the surface sediment sample. Nine Gram-negative bacterial strains including S3.2, S3.4, S3.10, S3.12, W3.17, W3.18, W3.20, W3.21 and W3.22 were able to growth and to completely uptake nitrite after 24 hours of incubation in minimal medium supplemented with 50 and 100 ppm nitrite. All of the 9 strains performed catalase and citrate catabolism activity but did not show nitrate reduction activity. Among these, strains S3.2, S3.4, W3.21 and W3.22 were able to hydrolyze starch; strains S3.12, S3.17, S3.18 and W3.20 were motile.

TÓM TẮT

Nước thải chế biến thủy sản có chứa nitrogen dưới dạng amonium, nitrite và nitrate. Trong đó, nitrite ở nồng độ cao có thể gây độc cho động vật thủy sinh, ô nhiễm nguồn nước, từ đó ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn từ nước thải chế biến thủy sản có khả năng hấp thu nitrite. Từ mẫu nước và mẫu bùn bề mặt được thu từ bể nước thải chế biến thủy sản, 37 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite đã được phân lập, trong đó, 24 dòng vi khuẩn được phân lập từ mẫu nước và 13 dòng vi khuẩn được phân lập từ mẫu bùn. Chín dòng vi khuẩn Gram âm gồm S3.2, S3.4, S3.10, S3.12, W3.17, W3.18, W3.20, W3.21 và W3.22 có khả năng tạo sinh khối cao và hấp thu hoàn toàn nitrite (nồng độ 50 và 100 ppm) ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Kết quả khảo sát đặc điểm sinh hóa cho thấy 9 dòng vi khuẩn đều có hoạt tính catalase, biến dưỡng citrate và không khử nitrate. Trong đó, 4 dòng vi khuẩn gồm S3.2, S3.4, W3.21 và W3.22 có khả năng thủy phân tinh bột, 4 dòng vi khuẩn S3.12, S3.17, S3.18 và W3.20 có khả năng di động.

1. GIỚI THIỆU

Những năm gần đây, thị trường tiêu thụ tôm tăng nhanh và mang lại nhiều lợi nhuận cho ngành xuất khẩu thủy sản. Bên cạnh những kết quả đạt được thì quá trình sơ chế tôm đang có nguy cơ gây ô nhiễm môi trường do những phế phụ phẩm phát sinh trong quá trình chế biến tôm như máu, thịt vụn, chất tẩy,… (Triết và ctv., 2008). Nước thải chế biến thủy sản

chứa nitrogen dưới dạng amonium, nitrite và nitrate. Hàm lượng nitrogen cao trong nước thải là nguyên nhân gia tăng các hợp chất có hại cho thủy sản chẳng hạn như nitrite (Funge-Smith & Briggs, 1998).

Trong nước, nitrite được chuyển hóa thành nitrate nhờ các vi khuẩn nitrate hóa. Tuy nhiên, khi nitrite tích tụ ở nồng độ cao sẽ gây độc cho động vật thủy sinh. Chẳng hạn, nitrite ảnh hưởng đến hoạt động sinh lý của tôm, cá như rối loạn bài tiết, tuần hoàn và thần kinh, làm cho tôm, cá chậm phát triển. Khi bị nhiễm nitrite ở nồng độ cao, tôm, cá có thể chết (Jensen, 2003). Cá nhiễm nitrite sẽ bị bệnh máu nâu, bị ngạt do nitrite ngăn cản sự vận chuyển oxygen trong máu (Hương & Vi, 2013).

Đồng bằng Sông Cửu Long có diện tích nuôi trồng thủy sản khá lớn và cũng là nơi tập trung các nhà máy chế biến thủy sản ở quy mô lớn. Tuy nhiên, nghiên cứu về phân lập vi khuẩn từ nước thải chế biến thủy sản có khả năng hấp thu nitrite còn hạn chế. Trong nghiên cứu của Ngân và Hiệp (2010), mật số vi khuẩn hữu ích trong ao nuôi tôm sú được khảo sát. Đồng thời, quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú ở tỉnh Sóc Trăng cũng đã được mô tả (Ngân, 2012). Trong nghiên cứu của Oanh và Mai (2017), dòng vi khuẩn BLW2.2 được phân lập từ ao nuôi tôm ở Bạc Liêu có khả năng hấp thu nitrite với hiệu suất 97,2% sau 3 ngày nuôi cấy. Từ những thực tiễn trên, nghiên cứu này được đề xuất thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn bản địa từ nước thải chế biến thủy sản có khả năng hấp thu nitrite hiệu quả. Kết quả của nghiên cứu này sẽ làm tiền đề cho các nghiên cứu xử lý nitrite trong môi trường nước.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu mẫu

Ba mẫu nước và ba mẫu bùn bề mặt được thu dọc theo chiều dài của bể nước thải sơ chế tôm đông lạnh (10x15m) của công ty trách nhiệm hữu hạn (TNHH) Hải sản Việt Hải. Công ty có trụ sở ở Km2087+500, quốc lộ 1A, xã Long Thạnh, huyện Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang. Sau khi thu, ba mẫu nước và ba mẫu bùn được trộn đều để thu một mẫu nước và một mẫu bùn đại diện. Hai mẫu đại diện được cho vào chai nhựa sạch, đậy nắp kín và bảo quản lạnh khi chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập vi khuẩn.

2.2. Phân lập vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite

Năm g mẫu bùn hoặc 5 mL mẫu nước được cho vào các bình tam giác có chứa 45 mL môi trường Winogradskyi có bổ sung 0,2 g/L (200 ppm) $NaNO_2$ đã được khử trùng. Mẫu được lắc với tốc độ 150 vòng/phút trên máy lắc trong 1 tuần (chọn lọc lần 1). Sau 7 ngày, mẫu được để lắng trong 30 phút. Sau đó, mẫu được hút 5 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn và chuyển sang bình tam giác mới có chứa 45 mL môi trường tương tự, tiếp tục lắc trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 1 tuần (giai đoạn này được lặp lại 2 lần: chọn lọc lần 2 và 3). Thành phần của môi trường Winogradskyi gồm $NaNO_2$ 0,2 g/L, Na_2CO_3 1 g/L, NaC1 0,5 g/L, K_2HPO_4 0,5 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g/L, $FeSO_4.7H_2O$ 0,4 g/L, và pH 7,8 (Bollmann et al., 2011).

Sau 3 lần chọn lọc, mẫu được để yên trong 30 phút. Phần chất lỏng phía trên được sử dụng để phân lập vi khuẩn hấp thu nitrite. Các bước phân lập vi khuẩn được tiến hành như sau: 100 µL dung dịch huyền phù vi khuẩn trong mẫu (sau khi chọn lọc lần 3) được hút và trải lên đĩa môi trường khoáng tối thiểu (MMN) có bổ sung 200 ppm $NaNO_2$. Bi thủy tinh được dùng để trải vi khuẩn phân bố đều khắp mặt đĩa và để trong tủ cấy cho đến khi bề mặt đĩa bốc hơi nước hoàn toàn. Sau đó, vi khuẩn được ủ ở 32°C trong 72 giờ. Khi vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc, các khuẩn lạc rời rạc và có đặc điểm hình thái khác nhau về màu sắc, kích thước, bìa,… được chọn để cấy chuyển nhiều lần sang môi trường cùng loại cho đến khi chọn được các khuẩn lạc đồng nhất về hình thái và nằm trên đường cấy. Sau đó, khuẩn lạc được cấy chuyển sang môi trường giàu dinh dưỡng Tryptone soya agar (TSA, 30 g/L Tryptone soya broth, 15 g/L agar) và ủ 32°C trong 24 giờ để kiểm tra độ thuần của vi khuẩn. Các dòng vi khuẩn thuần được nuôi cấy 3 ngày trên môi trường TSA và ghi nhận các đặc điểm hình thái khuẩn lạc bao gồm hình dạng, màu sắc, bìa, độ nổi, bề mặt, kích thước trung bình. Sau cùng, các dòng vi khuẩn tiềm năng được khảo sát một số đặc điểm sinh hoá gồm khả năng biến dưỡng citrate, hoạt tính catalase, tính di động, hoạt tính khử nitrate và thuỷ phân tinh bột (Dũng và ctv., 1972) và xác định Gram theo phương pháp nhuộm truyền thống (Ảnh, 2006).

Thành phần môi trường MMN gồm 1,4196 g Na_2HPO_4; 1,3609 g KH_4PO_4; 0,0985 g $MgSO_4.7H_2O$; 5,75 mg $CaCl_2.2H_2O$; 2,75 mg $FeSO_4.7H_2O$; 1,7 mg $MnSO_4.H_2O$; 1,16 mg H_3BO_3; 1,15 mg $ZnSO_4.7H_2O$; 0,24 mg $CuSO_4$; 3,2 mg Na_2.EDTA; 0,235 mg $CoCl_2.6H_2O$; 1000 mL H_2O; pH=7±0,2 (Oanh và ctv., 2014).

2.3. Khảo sát sự tăng trưởng trong môi trường có bổ sung nitrite và sự hấp thu nitrite của vi khuẩn

Chủng một khuẩn lạc của từng dòng vi khuẩn phân lập vào môi trường giàu dinh dưỡng Tryptone

soya broth (TSB, 30 g/L). Vi khuẩn được nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút qua đêm. Mật độ quang (OD_{600nm}) của các dung dịch huyền phù vi khuẩn được kiểm tra và điều chỉnh về cùng một giá trị OD_{600nm}= 0,6 (tương đương 10^7 CFU/mL). Sau đó, 40 µL dung dịch huyền phù từng dòng vi khuẩn được chủng vào ống nghiệm có chứa 4 mL môi trường MMN được bổ sung $NaNO_2$ ở các nồng độ 75 ppm (tương đương 50 ppm NO_2^-) và 150 ppm (tương đương 100 ppm NO_2^-). Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không có chủng vi khuẩn. Vi khuẩn được nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau 24 giờ nuôi cấy, mật độ quang (OD_{600nm}) của các dung dịch huyền phù vi khuẩn được kiểm tra và nitrite còn lại trong mẫu được định lượng.

Khả năng sinh trưởng của các dòng vi khuẩn được xác định sau 24 giờ nuôi cấy bằng cách chuyển 200 µL từng dung dịch huyền phù vi khuẩn vào đĩa 96 giếng và đo mật độ quang ở bước sóng 600 nm.

Nitrite được định lượng bằng phương pháp Griess (APHA, 2001) theo phương trình đường chuẩn $y = 0,3595x + 0,0867$ ($R^2 = 0,9994$), trong đó, y là độ hấp thụ quang ở bước sóng 540 nm, x là hàm lượng nitrite. Hàm lượng nitrite còn lại trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn được xác định như sau: 1,5 mL dung dịch huyền phù của từng dòng vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung nitrite được chuyển vào ống eppendorf và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tế bào vi khuẩn. Bốn trăm µL dung dịch sau ly tâm được chuyển vào ống eppendorf mới, bổ sung 400 µL thuốc thử sulfanilamide (1 g $C_6H_8N_2O_2^-S$ được hòa tan trong 100 mL dung dịch H_3PO_4 5%) và để yên 5-10 phút. Sau đó, 400 µL thuốc thử napthylendiamine dihydrochloride (NED, 0,1 g NED được hòa tan trong 100 mL nước cất) được bổ sung vào hỗn hợp và tiếp tục để yên trong 5-10 phút. Cuối cùng, 200 µL dung dịch sau phản ứng được chuyển vào đĩa 96 giếng và đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở bước sóng 540 nm.

Phần mềm Microsoft Excel 2010 được sử dụng để nhập và xử lý số liệu thô, tính các trung bình và vẽ biểu đồ. Phần mềm Minitab 16 được dùng để phân tích ANOVA và kiểm định trung bình các nghiệm thức bằng kiểm định Tukey.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite

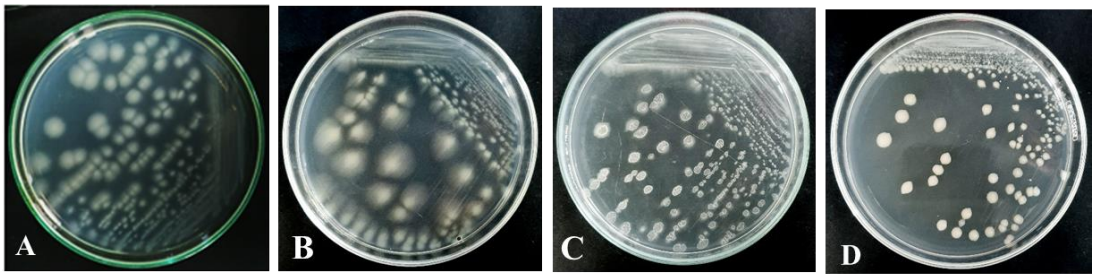
Từ mẫu nước và mẫu bùn bề mặt được thu trong bể nước thải sơ chế tôm đông lạnh của công ty TNHH Hải sản Việt Hải, 37 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite đã được phân lập, trong đó, 24 dòng được phân lập từ mẫu nước và 13 dòng được phân lập từ mẫu bùn bề mặt. Các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu trắng sữa, bìa nguyên, lài, bề mặt trơn. Đặc điểm của các dòng vi khuẩn phân lập được trình bày trong Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn đại diện được minh họa ở Hình 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite

TT	Nguồn gốc	Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc					
			Hình dạng	Màu sắc	Bìa	Độ nổi	Bề mặt	Kích thước (mm)*
1	Mẫu bùn bề mặt	S3.1	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	trơn	0,5
2		S3.2	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	4x3
3		S3.3	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	trơn	3,5
4		S3.4	không đều	trắng đục	chia thùy	mô	nhăn	5x3
5		S3.5	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	8x14
6		S3.6	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	3,5x4
7		S3.7	tròn	trắng sữa	nguyên	mô	trơn	1
8		S3.8	tròn	trắng sữa	nguyên	mô	trơn	0,5
9		S3.9	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	trơn	3,5
10		S3.10	tròn	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	4
11		S3.11	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	trơn	2
12		S3.12	tròn	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	2
13		S3.13	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	4x2
14		W3.1	tròn	trắng sữa	nguyên	lài	trơn	2
15		W3.2	tròn	trắng ngà	nguyên	lài	trơn	2
16		W3.3	tròn	trắng sữa	nguyên	lài	trơn	1
17		W3.4	tròn	trắng đục	nguyên	lài	trơn	2

TT	Nguồn gốc	Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc					
			Hình dạng	Màu sắc	Bìa	Độ nổi	Bề mặt	Kích thước (mm)*
18		W3.5	tròn	trắng đục	nguyên	lài	trơn	1
19		W3.6	tròn	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	3
20		W3.7	không đều	trắng sữa	chia thùy	lài	trơn	2x4
21		W3.8	không đều	trắng đục	chia thùy	lài	trơn	3x4
22		W3.9	không đều	trắng sữa	chia thùy	lài	trơn	5x7
23		W3.10	tròn	trắng đục	nguyên	lài	trơn	2
24		W3.11	tròn	vàng	nguyên	lài	trơn	1
25	Mẫu	W3.12	tròn	vàng	nguyên	lài	trơn	2
26	nước	W3.14	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	3x5
27		W3.13	không đều	trắng sữa	chia thùy	lài	trơn	3x6
28		W3.15	tròn	trắng đục	nguyên	lài	trơn	3
29		W3.16	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	4x12
30		W3.17	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	4x10
31		W3.18	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	4x11
32		W3.19	không đều	trắng sữa	chia thùy	lài	trơn	2x5
33		W3.20	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	2x4
34		W3.21	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	6x11
35		W3.22	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	3x8
36		W3.23	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	5x4
37		W3.24	không đều	trắng ngà	chia thùy	lài	trơn	3x6

** Kích thước trung bình được đo từ 3 khuẩn lạc*



Hình 1. Một số dòng khuẩn phân lập đại diện khi được nuôi cấy 3 ngày trên môi trường TSA

A: dòng W3.8; B: dòng S3.6; C: dòng S3.4; D: dòng W3.10

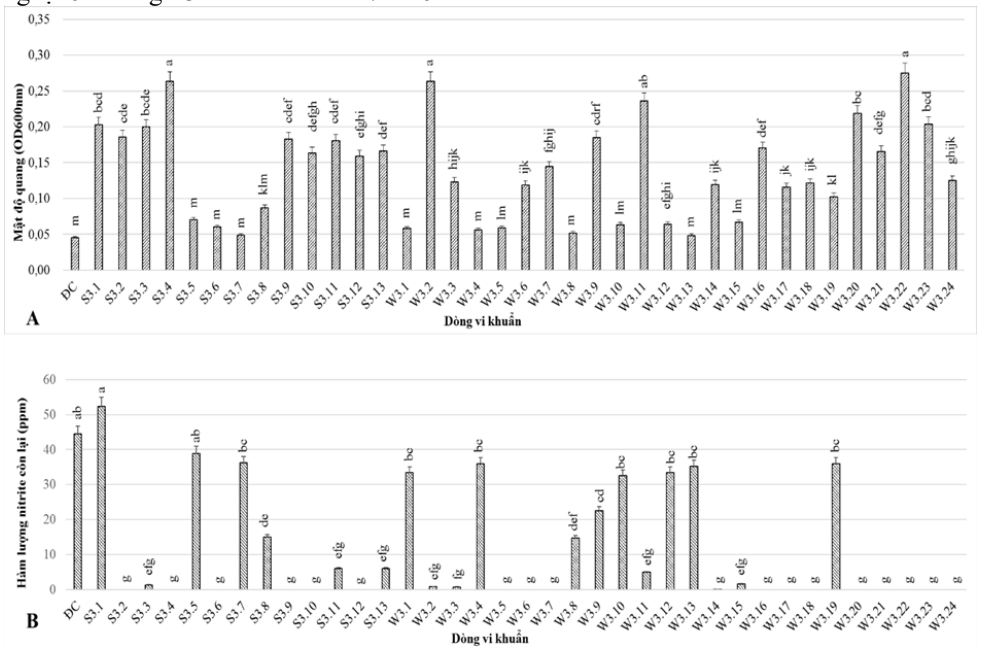
3.2. Khả năng tăng trưởng và hấp thu nitrite của các dòng vi khuẩn phân lập

Kết quả khảo sát khả năng tăng trưởng và hấp thu nitrite của 37 dòng vi khuẩn phân lập cho thấy có sự khác biệt về sự tăng trưởng và hấp thu nitrite giữa các dòng vi khuẩn khi được nuôi cấy trong môi trường MMN có bổ sung 50 ppm và 100 ppm nitrite ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy.

Khi được nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 50 ppm nitrite, 3/37 dòng vi khuẩn tăng trưởng tạo sinh khối cao nhất gồm S3.4, W3.2 và W3.22, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và so với các dòng vi khuẩn còn lại, ngoại trừ dòng W3.11 (Hình 2A). Kết quả khảo sát khả năng hấp thu nitrite cho thấy 28/37 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite cao ở nồng độ 50 ppm với hàm lượng nitrite còn lại tối đa là 22,54 ppm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và so với các dòng vi khuẩn còn lại. Trong đó, 17 dòng vi khuẩn gồm S3.2, S3.4, S3.6, S3.9, S3.10, S3.12, W3.5, W3.6, W3.7, W3.16, W3.17, W3.18, W3.20, W3.21, W3.22, W4.23 và W3.24 hấp thu hoàn toàn 50 ppm nitrite ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy (Hình 2B).

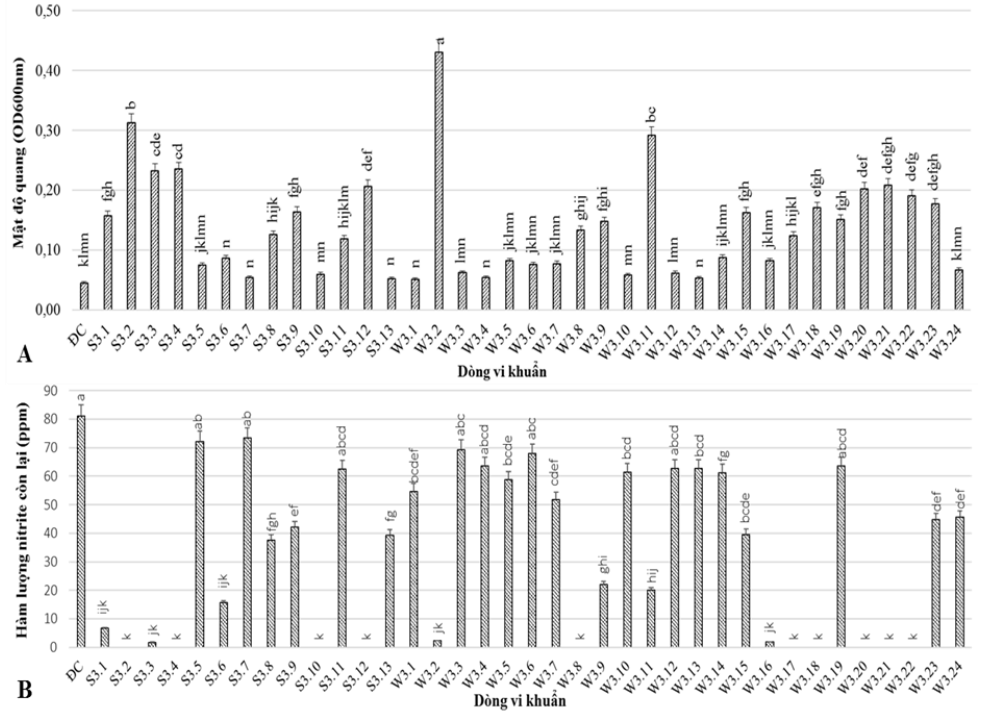
Dòng W3.22 có khả năng tăng trưởng cao nhất với giá trị OD_{600nm} đạt 0,28 và hấp thu hoàn toàn nitrite ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Kết quả định lượng nitrite cho thấy các dòng vi khuẩn hấp thu nitrite cao bao gồm 4 dòng tạo sinh khối cao nhất (giá trị OD_{600nm} đạt trong khoảng 0,24 - 0,28) như S3.4, W3.2, W3.11, W3.22 và các dòng tạo sinh khối trung bình (giá trị OD_{600nm} đạt trong khoảng 0,06 - <0,24). Các dòng vi khuẩn có khả năng hấp

thu nitrite kém là những dòng có sinh khối thấp (giá trị OD_{600nm} đạt trong khoảng 0,05 - < 0,06) (Hình 2A và 2B), ngoại trừ dòng S3.1 có sinh khối vi khuẩn đạt mức trung bình nhưng khả năng hấp thu nitrite kém nhất.



Hình 2. Khả năng tăng trưởng (A) và hấp thu nitrite (50 ppm) (B) của vi khuẩn phân lập

Các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (P<0,05).



Hình 3. Khả năng tăng trưởng (A) và hấp thu nitrite (100 ppm) (B) của vi khuẩn phân lập

Các ký tự chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (P<0,05).

Khi được nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 100 ppm nitrite, dòng vi khuẩn tăng trưởng tạo sinh khối cao nhất là W3.2 với giá trị mật độ quang đạt 0,43, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và so với các dòng vi khuẩn còn lại (Hình 3A). Kết quả khảo sát khả năng hấp thu nitrite cho thấy 17/37 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite cao ở nồng độ 100 ppm, đạt hiệu suất trên 70%, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và so với các dòng vi khuẩn còn lại. Trong đó, 10 dòng vi khuẩn gồm S3.2, S3.4, S3.10, S3.12,W3.8, W3.17, W3.18, W3.20, W3.21 và W3.22 hấp thu hoàn toàn 100 ppm nitrite sau 24 giờ nuôi cấy (Hình 3B).

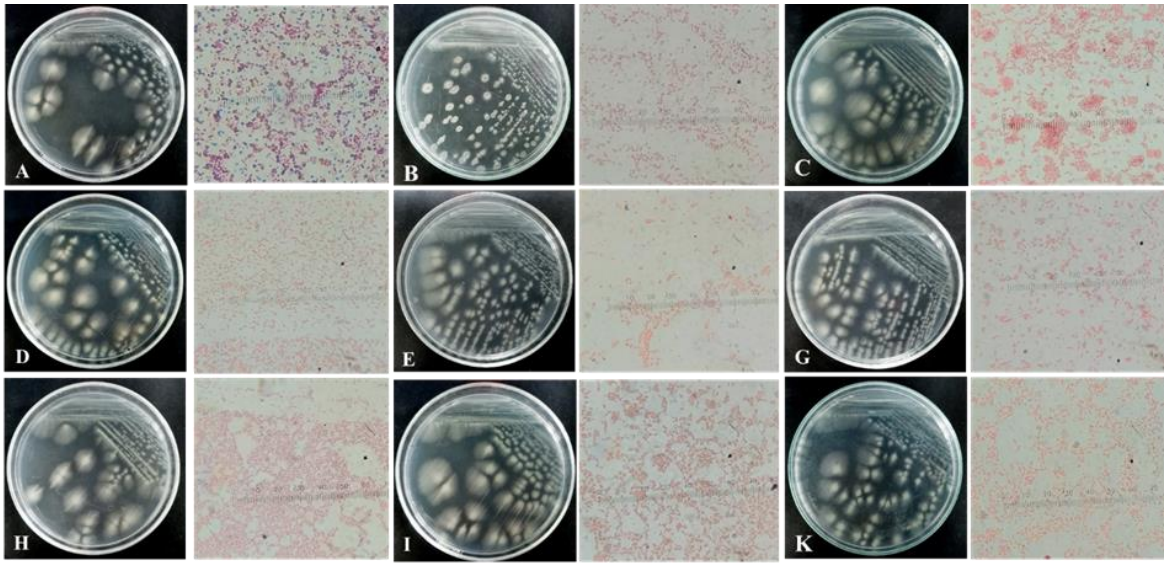
Dòng S3.2 có khả năng tăng trưởng thấp hơn nhưng hấp thu nitrite cao hơn so với dòng W3.2. Giá trị mật độ quang của dòng S3.2 đạt 0,31 và hấp thu hoàn toàn 100 ppm nitrite ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Kết quả khảo sát ở nồng độ nitrite 100 ppm cũng cho thấy các dòng vi khuẩn hấp thu nitrite cao gồm các dòng tạo sinh khối cao (giá trị OD_{600nm} đạt trong khoảng 0,29 - 0,43) và các dòng tạo sinh khối trung bình (giá trị OD_{600nm} đạt trong khoảng 0,13 - 0,24) (Hình 3A). Các dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite thấp là các dòng có sinh khối thấp khi được nuôi cấy trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung nitrite (Hình 3A và 3B), ngoại trừ dòng W3.19 có sinh khối đạt mức trung bình nhưng khả năng hấp thu nitrite thấp nhất.

Trong các dòng vi khuẩn phân lập, 9 dòng vi khuẩn gồm S3.2, S3.4, S3.10, S3.12, W3.17, W3.18, W3.20, W3.21 và W3.22 có khả năng hấp thu hoàn toàn nitrite ở cả 2 nồng độ khảo sát. Khi so sánh với các nghiên cứu trước đây, có thể thấy, dòng vi khuẩn *Nitrobacter* sp. NB1 được phân lập từ bùn thải của bể xử lý sinh học trong khu xử lý chất thải rắn ở Bình Dương có khả năng hấp thu 97,08% nitrite ở thời điểm 24 giờ khi được nuôi cấy trong môi trường MMN có bổ sung 2 g/L $NaNO_2$ (Phùng & Trang, 2017). Trong nghiên cứu của Oanh và Mai (2017), 16 dòng vi khuẩn hấp thu nitrite được phân lập từ mẫu bùn thu tại các ao nuôi tôm ở Bạc Liêu. Trong đó, dòng vi khuẩn BLW2.2 có khả năng hấp thu nitrite cao nhất, đạt 97,2% ở thời điểm 3 ngày nuôi cấy trong môi trường MMN có bổ sung 37,5 mg/L $NaNO_2$ (tương đương 25 ppm nitrite). Trong nghiên cứu này, 9 dòng vi khuẩn phân lập từ nước thải chế biến thủy sản có khả năng hấp thu hoàn toàn nitrite sau 24 giờ nuôi cấy ở nồng độ 50 và 100 ppm (tương đương 75 và 150 mg/L $NaNO_2$). So với dòng vi khuẩn *Nitrobacter* sp. NB1 thì 9 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite ở nồng độ thấp hơn. Tuy nhiên, những dòng vi khuẩn này có khả năng hấp thu nitrite ở nồng độ cao hơn và trong khoảng thời gian ngắn hơn so với dòng vi khuẩn BLW2.2 được phân lập từ ao nuôi tôm ở Bạc Liêu.

Chín dòng vi khuẩn S3.2, S3.4, S3.10, S3.12, W3.17, W3.18, W3.20, W3.21 và W3.22 có một số đặc điểm sinh hoá tương đồng, chẳng hạn, tất cả đều có hoạt tính catalase, biến dưỡng citrate và không khử nitrate. Trong đó, 4 dòng vi khuẩn S3.2, S3.4, W3.21 và W3.22 có khả năng thủy phân tinh bột, 4 dòng vi khuẩn S3.12, S3.17, S3.18 và W3.20 có khả năng di động. Kết quả nhuộm Gram của 9 dòng vi khuẩn cho thấy tất cả đều là Gram âm, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Ngân (2012) về các dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite. Hình thái khuẩn lạc, tế bào và đặc điểm sinh hóa của 9 dòng vi khuẩn tiềm năng được minh họa ở Hình 4 và Bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm sinh hóa của 9 dòng vi khuẩn

Dòng vi khuẩn	Đặc điểm sinh hóa					
	Hoạt tính catalase	Thủy phân tinh bột	Khử nitrate	Biến dưỡng citrate	Di động	Gram
S3.2	+	+	-	+	-	-
S3.4	+	+	-	+	-	-
S3.10	+	-	-	+	-	-
W3.12	+	-	-	+	+	-
W3.17	+	-	-	+	+	-
W3.18	+	-	-	+	+	-
W3.20	+	-	-	+	+	-
W3.21	+	+	-	+	-	-
W3.22	+	+	-	+	-	-



Hình 4. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn tiềm năng khi được nuôi cấy 3 ngày trên môi trường TSA

A: dòng S3.2; B: dòng S3.4; C: dòng S3.10; D: dòng S3.12; E: dòng W3.17; G: dòng W3.18; H: dòng W3.20; I: dòng W3.21 và K: dòng W3.22

4. KẾT LUẬN

Từ mẫu nước và bùn được thu tại bể nước thải sơ chế tôm đông lạnh ở công ty TNHH Hải sản Việt Hải, 37 dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu nitrite đã được phân lập. Trong đó, 9 dòng vi khuẩn gồm S3.2, S3.4, S3.10, S3.12, W3.17, W3.18, W3.20, W3.21 và W3.22 có khả năng tạo sinh khối cao và hấp thu hoàn toàn nitrite (50 và 100 ppm) ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy. Chín dòng vi khuẩn được tuyển chọn đều là vi khuẩn Gram âm, có hoạt tính catalase, biến dưỡng citrate và không khử nitrate. Trong đó, 4 dòng vi khuẩn S3.2, S3.4, W3.21 và W3.22 có khả năng thủy phân tinh bột, 4 dòng vi khuẩn S3.12, S3.17, S3.18 và W3.20 có khả năng di động. Các dòng vi khuẩn hấp thu nitrite hiệu quả có thể được tiếp tục nghiên cứu làm cơ sở để ứng dụng xử lý nitrite trong môi trường nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ảnh, K. H. (2006). *Giáo trình Vi sinh vật học* (Phần 1). Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

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

Bollmann, A., French, E., & Laanbroek, H. J. (2011). Isolation, cultivation, and characterization of ammonia-oxidizing bacteria and archaea adapted to low ammonium concentrations. *In Methods in enzymology* (Vol. 486, pp. 55-88). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381294-0.00003-1

Dũng, N. L., Mượu, Đ. X., Tiến, N. P., Trạch, Đ, Đ., & Ty, P. V. (1972). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học* (Tập 1). Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật Hà Nội.

Funge-Smith, S. J., & Briggs, M. R. P. (1998). Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture, 164*(1), 117-133. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00181-1

Hương, Đ. T. T., & Vi, L.T. T. (2013). Ảnh hưởng của nitrite lên một số chỉ tiêu huyết học và tăng trưởng của cá Lóc (*Channa striate*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 27*, 154-160.

Jensen, F. B. (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, *135*, 9-24. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00323-9

Ngân, P. T. T. (2012). *Nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú (Penaeus monodon)* (Luận án tiến sĩ). Trường Đại học Cần Thơ.

Ngân, P. T. T., & Hiệp, N. (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.

Oanh, N. T. P., & Mai, N. T. (2017). 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. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2019.170

Oanh, N. T. P., Helbling, D. E., Bers, K., Fida, T. T., Wattiez, R., Kohler, H. P. E., Springael, D., & Mot, D. R. (2014). Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in Novosphingobium sp. KN65.2. *Applied Microbiology and Biotechnology, 98*(19), 8235-8252. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5858-5

Phùng, T. N., & Trang, H. T. K. (2017). Phân lập và thử nghiệm khả năng xử lý nitrite trong nước ri rác của vi khuẩn *Nitrobacter* sp. *Tạp chí Khoa học Đại học Thủ Dầu Một, 3*(34), 55-61.

Triết, L. M., Hùng, N. T., & Dân, H. N. (2008). *Xử lý nước thải đô thị và công nghiệp - Tính toán thiết kế công trình* (tái bản lần 3). Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.