

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

**TRƯỜNG PHƯỚC THIÊN HOÀNG**

**NGHIÊN CỨU VI KHUẨN CHUYỂN HÓA NITƠ TRONG  
NỀN ĐÁY VÙNG NUÔI TÔM HÙM (*Panulirus* sp.)  
PHỤC VỤ NUÔI TRỒNG THỦY SẢN**

**Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học**

**Mã số: 9.42.02.01**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**TP. HCM - Năm 2022**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

**TRƯỜNG PHƯỚC THIÊN HOÀNG**

**NGHIÊN CỨU VI KHUẨN CHUYỂN HÓA NITƠ TRONG  
NỀN ĐÁY VÙNG NUÔI TÔM HÙM (*Panulirus* sp.)  
PHỤC VỤ NUÔI TRỒNG THỦY SẢN**

**Chuyên ngành : Công nghệ sinh học**

**Mã số : 9.42.02.01**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Phú Hòa**

**PGS.TS. Phạm Công Hoạt**

**TP.HCM - Năm 2022**

## LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian học tập, thực hiện và hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ tận tình của tập thể Quý Thầy Cô, các cơ quan, các anh chị và các bạn. Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn chân thành đến:

**PSG.TS Nguyễn Phú Hòa và PGS.TS Phạm Công Hoạt** đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, truyền đạt nhiều kinh nghiệm và kiến thức quý báu giúp tôi hoàn thành tốt luận án.

**TS. Hoàng Quốc Khánh, PGS.TS Nguyễn Bảo Quốc** đã động viên, hỗ trợ nhiệt tình về chuyên môn.

Ban Giám Hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM, Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Khoa Khoa học Sinh học, Khoa Thủy Sản, Phòng Đào tạo Sau Đại học đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Tập thể các bạn nghiên cứu viên, học viên cao học, sinh viên từ phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Viện Nghiên cứu Công Nghệ Sinh học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm Tp.HCM đã hỗ trợ, giúp đỡ để tôi học tập, thực hiện và hoàn thành tốt luận án.

Tất cả bạn bè và đồng nghiệp những người luôn động viên, giúp đỡ chân thành tôi trong quá trình làm luận án.

Ba Mẹ và những người thân trong gia đình, chồng và các con đã luôn ủng hộ, động viên và là điểm tựa tinh thần cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

**Nghiên cứu sinh**

**Trương Phước Thiên Hoàng**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi cam đoan những công bố trong luận văn này là trung thực và một phần kết quả nghiên cứu thuộc đề tài cấp nhà nước mã số ĐTĐL.CN-60/15 do PGS. TS. Nguyễn Phú Hòa làm chủ nhiệm. Những số liệu trong luận văn được phép công bố với sự đồng ý của chủ nhiệm đề tài. Tất cả các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là chưa từng được công bố trong thời gian trước đây bởi tác giả khác.

**TRƯƠNG PHƯỚC THIÊN HOÀNG**

## TÓM TẮT

Nghiên cứu vi khuẩn chuyển hóa nitơ trong nền đáy vùng nuôi tôm hùm (*Panulirus* sp.) phục vụ nuôi trồng thủy sản được thực hiện với các nội dung sau: (1) Nghiên cứu đã tiến hành phân lập và định danh vi khuẩn từ các mẫu bùn được lấy từ nền đáy dưới các lồng bè nuôi tôm hùm ở vùng Vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên trong thời gian 12 tháng; (2) Nghiên cứu tạo môi trường lên men dạng lỏng và dạng bán rắn phù hợp cho các chủng vi khuẩn có khả năng tạo chế phẩm sinh học xử lý môi trường; (3) Đánh giá chế phẩm vi sinh xử lý môi trường trong mô hình ương tôm thẻ chân trắng giai đoạn post 5 ở qui mô 1m<sup>3</sup>.

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được các chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa ammonia và nitrite. Các chủng vi khuẩn được định danh bằng phương pháp kiểm tra đặc điểm hình thái, sinh hóa bằng kit API 20E, 20NE, phương pháp giải trình tự vùng 16S – rRNA và xác định khả năng chuyển hóa ammonia và nitrite; trong đó có 3 chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> có khả năng chuyển hóa ammonia, nitrite tốt nhất.

Luận án đã nghiên cứu được thành phần môi trường dạng lỏng phù hợp cho sự phát triển của 3 chủng vi khuẩn trên mô hình Box – Behnken như sau: thành phần môi trường cho vi khuẩn *B.licheniformis* B85 ở mật số 3,14 x 10<sup>11</sup> CFU/mL bao gồm 3,94 g/L mật rỉ đường, 15,56 g/L cao nấm men và 1,13 g/L NaCl; Mật độ vi khuẩn *P.stutzeri* KL15 là 2,37 x 10<sup>11</sup> CFU/mL với thành phần môi trường gồm 4,95 g/L mật rỉ đường, 19,08 g/L cao nấm men và 1,13 g/L MgSO<sub>4</sub>; Đối với chủng vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub>, thành phần môi trường là 7,93 g/L glucose, 6,1 g/L pepton và 2,95 g/L NaCl với mật số vi khuẩn là 2,52 x 10<sup>10</sup> CFU/mL.

Ba chủng vi khuẩn trên được nuôi cấy trên môi trường bán rắn với tỷ lệ giống, thời gian và độ ẩm thích hợp, sau đó được sấy và nghiền mịn để tạo chế phẩm vi sinh dạng bột với mật số vi khuẩn 10<sup>9</sup> CFU/g. Chế phẩm vi sinh dạng bột được bảo quản ở hai khoảng nhiệt độ: nhiệt độ lạnh 4 - 8°C và nhiệt độ phòng 28-32°C. Ở

nhiệt độ 4 - 8°C, mật số vi khuẩn được bảo quản tốt hơn, sau 360 ngày thì mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15, *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> có giảm từ 10<sup>9</sup> CFU/g còn 10<sup>6</sup> CFU/g, vi khuẩn *B.licheniformis* B85 giảm từ 10<sup>9</sup> CFU/g còn 10<sup>7</sup> CFU/g. Đối với bảo quản ở nhiệt độ phòng 28-32° C, sau 360 ngày, mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 và *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> có giảm từ 10<sup>9</sup> CFU/g còn 10<sup>5</sup> CFU/g, mật số vi khuẩn *B. licheniformics* B85 giảm từ 10<sup>9</sup> CFU/g còn 10<sup>6</sup> CFU/g. Vi khuẩn *B. licheniformics* B85 là nhóm vi khuẩn sinh bào tử nên có mật độ vi khuẩn cao hơn so với 2 chủng vi khuẩn còn lại.

Kết quả đánh giá hiệu quả xử lý môi trường của chế phẩm vi sinh trên mô hình ương giống tôm thẻ chân trắng ở giai đoạn postlarvae 5 trong bể xi măng 1m<sup>3</sup> cho thấy khả năng kiểm soát tốt hàm lượng TAN, NO<sub>2</sub> và NO<sub>3</sub> với tỷ lệ chế phẩm là 0,5% với mật độ 10<sup>8</sup> CFU/g, sử dụng định kỳ 6 ngày/1 lần.

## SUMMARY

The study on nitrogen-metabolizing bacteria in the bottom of lobster (*Panulirus* sp.) culture area for aquaculture was carried out with the following contents: (1) The study was conducted to isolate and identify bacteria from sludge samples which were taken from the bottom of lobster cages in Xuan Dai Bay, Phu Yen province during 12 months (2) Research on create suitable liquid and semi-solid media for bacterial strains to make biological products to treat the environment; (3) Experimenting with the use of microbiological products for environmental treatment in the 5-day old postlarvae of white leg shrimp rearing in 1m<sup>3</sup> - cement tanks.

The results shown that bacterial strains capable of metabolizing ammonia and nitrite in the bottom sludge, strains were identified by morphological, biochemical and DNA marker characterization by API 20E, 20NE kit and 16S - rRNA region sequencing method and determined the ability to metabolize ammonia, nitrite. Three strains of *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, and *Rhodococcus rhodochrous* T9 were able to metabolize ammonia and nitrite in highest efficiency. The thesis has optimized the composition of liquid medium of 3 bacterial strains on the Box - Behnken model as follows: the composition of the medium of *Bacillus licheniformis* B85 at the density of  $3,14 \times 10^{11}$  CFU/mL includes molasses, yeast extract and NaCl. The density of *Pseudomonas stutzeri* KL15 was  $2,37 \times 10^{11}$  CFU/mL with the media composition including molasses, yeast extract and MgSO<sub>4</sub>. For the strain *Rhodococcus rhodochrous* T9, the media composition was glucose, peptone and NaCl with a bacterial density of  $2,52 \times 10^{10}$  CFU/mL.

The above three bacterial strains were cultured on semi-solid media with suitable time and humidity, then dried and ground to produce a powdered probiotic product with a bacterial density of  $10^9$  CFU/gram. Powder microbiology mode is stored at two temperature ranges: cold temperature 4-8°C and room temperature 28-32°C. At a temperature of 4 - 8°C, the bacterial density was better preserved, after

360 days, the density of *P.stutzeri* KL15, *R.rhodochrous* T9 decreased from  $10^9$  CFU/g to  $10^6$  CFU/g, *B.licheniformis* B85 reduced from  $10^9$  CFU/g to  $10^7$  CFU/g. For storage at temperature 28-32°C, after 360 days, the density of *P.stutzeri* KL15 and *R.rhodochrous* T9 decreased from  $10^9$  CFU/g to  $10^5$  CFU/g, the density of *B.licheniformis* B85 reduced from  $10^9$  CFU/g to  $10^6$  CFU/g. *B. licheniformis* B85 is a group of spore-forming bacteria, so it has a higher concentration of bacteria than *P.stutzeri* KL15 and *R.rhodochrous* T9.

The results of evaluation of the environmental treatment efficiency of probiotic products in water of the white leg shrimp nursing cement tank showed the ability to control the content of TAN, NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> well with a density of  $10^8$  CFU/g, used periodically every 6 days.



# MỤC LỤC

Trang tựa .....	i
Lời cảm ơn .....	ii
Lời cam đoan.....	iii
Tóm tắt .....	iv
Summary .....	vi
Mục lục.....	viii
Danh sách chữ viết tắt .....	xiv
Danh sách các bảng.....	xv
Danh sách các hình.....	xvii
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>5</b>
1.1. Tổng quan tình hình nuôi tôm hùm lông bè.....	5
1.2. Hiện trạng ô nhiễm môi trường nước vùng nuôi tôm hùm Vịnh Xuân Đài.....	6
1.3. Vi sinh vật trong môi trường nước mặn.....	7
1.4. Sơ đồ chu trình chuyển hóa nitơ trong hệ sinh thái biển .....	8
1.5. Các quá trình chuyển hoá nitơ và vai trò các nhóm vi khuẩn tham gia chuyển hóa .....	11
1.6. Đặc điểm của các nhóm vi khuẩn tham gia quá trình chuyển hóa Nitơ .....	13
1.6.1. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn <i>Bacillus</i> .....	13
1.6.2. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn <i>Rhodococcus</i> .....	15
1.6.3. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn <i>Pseudomonas</i> .....	15
1.6.4. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn <i>Stenotrophomonas</i> .....	16
1.6.5. Đặc điểm sinh học của các nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ khác.....	17
1.7. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn.....	18
1.7.1. Nguồn Cacbon.....	18
1.7.2. Nguồn Nitơ.....	18
1.7.3. Nguồn khoáng và vitamin .....	18

1.7.4. Mật độ giống .....	19
1.7.5. Thời gian nuôi cấy.....	19
1.7.6. Nhiệt độ .....	19
1.7.7. Độ pH .....	19
1.7.8. Động học của quá trình vi sinh vật .....	19
1.8. Sơ lược về ma trận Plackett - Burman và Box - Behnken .....	20
1.8.1. Giới thiệu phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM).....	20
1.8.2. Ma trận Plackett - Burman .....	20
1.8.3. Ma trận Box-Behnken (BBD) .....	21
1.9. Các yếu tố ảnh hưởng đến môi trường nước nuôi tôm thẻ chân trắng.....	21
1.9.1. Ammonia tổng cộng (TAN - Total Ammonia Nitrogen).....	21
1.9.2. Nitrite và Nitrate .....	22
1.10. Tình hình nghiên cứu ứng dụng của vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản ....	22
1.10.1. Tình hình ứng dụng vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản trong nước .....	22
1.10.2. Tình hình ứng dụng vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản trên thế giới .....	24
<b>CHƯƠNG 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>26</b>
2.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	26
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	26
2.3. Phương pháp thu mẫu bùn đáy.....	27
2.3.1. Vị trí thu mẫu .....	27
2.3.2. Phương pháp phân tích hóa lý của mẫu bùn: .....	27
2.4. Nội dung 1: Phân lập và định danh vi khuẩn chuyển hóa Nitơ từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm.....	28
2.4.1. Phân lập và định danh vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. chuyển hóa ammonia .....	28
2.4.1.1. Phân lập vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	28
2.4.1.2. Phương pháp định danh sinh hóa vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	28
2.4.1.3. Phương pháp định danh sinh học phân tử vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	28
2.4.2. Phân lập và định danh vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB).....	29
2.4.2.1. Môi trường phân lập vi khuẩn chuyển hóa ammonia (phụ lục 1.3.1).....	29

2.4.2.2. Các bước phân lập nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia .....	29
2.4.2.3. Phương pháp định danh sinh hóa vi khuẩn AOB.....	31
2.4.2.4. Phương pháp định danh sinh học phân tử vi khuẩn AOB.....	31
2.4.3. Phương pháp phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB).....	32
2.4.3.1. Môi trường phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite.....	32
2.4.3.2. Các bước phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB).....	32
2.4.3.3. Phương pháp định danh sinh hóa vi khuẩn NOB.....	32
2.4.3.4. Phương pháp định danh sinh học phân tử vi khuẩn NOB.....	33
2.4.4. Khảo sát quá trình chuyển hóa ammonium, nitrite, nitrate của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn.....	33
2.4.5. Khảo sát khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn.....	34
2.5. Nội dung 2: Tạo chế phẩm vi sinh dạng lỏng và dạng bột .....	34
2.5.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng nuôi cấy và tối ưu hóa thành phần môi trường lên men tạo chế phẩm dạng lỏng của các chủng vi khuẩn .....	34
2.5.1.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng sinh khối ba chủng vi khuẩn...34	
2.5.1.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo chế phẩm dạng lỏng.....35	
2.5.1.3. Tối ưu hóa các thành phần môi trường nhân sinh khối của 3 chủng vi khuẩn bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RMS). .....	36
2.5.2. Chế tạo chế phẩm vi sinh dạng bột .....	42
2.5.2.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện sản xuất của các chủng vi khuẩn trên môi trường bán rắn .....	42
2.5.2.2. Bảo quản chế phẩm vi sinh dạng bột .....	43
2.6. Nội dung 3: Đánh giá chuyển hóa nitơ của các chủng vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản.....	43
2.6.1. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở qui mô phòng thí nghiệm.....	43
2.6.2. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong nuôi tôm thẻ chân trắng giai đoạn ương giống ở qui mô bể xi-măng 1m <sup>3</sup> .....	44
2.6.3. Chỉ tiêu đánh giá .....	46

2.7. Xử lý thống kê.....	46
<b>CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>47</b>
3.1. Nội dung 1: Phân lập và định danh vi khuẩn chuyển hóa Nitơ từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm.....	47
3.1.1. Các chỉ tiêu môi trường trong mẫu bùn được thu ở Vùng Vịnh Xuân Đài.....	47
3.1.2. Nhóm vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. chuyển hóa ammonia.....	48
3.1.2.1. Kết quả phân lập vi khuẩn <i>Bacillus</i> chuyển hóa ammonia.....	48
3.1.2.2 Chọn lọc khả năng xử lý ammonia của các vi khuẩn phân lập được.....	48
3.1.2.3. Kết quả định danh sinh hóa của các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	49
3.1.2.4. Kết quả định danh sinh học phân tử các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.....	49
3.1.2.5. Kết quả đánh giá khả năng chuyển hóa ammonia của các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. đã phân lập.....	51
3.1.3. Kết quả phân lập vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB) từ mẫu bùn.....	53
3.1.3.1. Kết quả xác định vi khuẩn chuyển hóa ammonia có trong mẫu bùn. ....	53
3.1.3.2. Kết quả đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập được.....	54
3.1.3.3. Kết quả xác định khả năng chuyển hóa NH <sub>3</sub> của các chủng vi khuẩn.....	54
3.1.3.4. Kết quả định danh sinh hóa các chủng vi khuẩn.....	55
3.1.3.5. Kết quả định danh bằng giải trình tự vùng 16S – rRNA.....	57
3.1.3.6. Kết quả đánh giá khả năng chuyển hóa ammonia của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.....	59
3.1.4. Kết quả phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite từ mẫu bùn.....	61
3.1.4.1. Kết quả xác định vi khuẩn chuyển hóa nitrite có trong mẫu bùn. ....	61
3.1.4.2. Kết quả đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập được.....	62
3.1.4.3. Kết quả xác định khả năng chuyển hóa NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> của các chủng vi khuẩn.....	62
3.1.4.4. Kết quả định danh sinh hóa các chủng vi khuẩn.....	63
3.1.4.5. Định danh vi khuẩn bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA.....	66
3.1.4.6. Kết quả đánh giá khả năng chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.....	70

3.1.5. Khảo sát khả năng chuyển hóa các hợp chất chứa nitơ và khả năng chịu mặn của các nhóm vi khuẩn thuộc chi <i>Bacillus</i> , AOB và NOB. ....	71
3.1.5.1. Khảo sát khả năng chuyển hóa $\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}_3^-$ và khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> , vi khuẩn AOB.....	71
3.1.5.2. Khảo sát khả năng chuyển hóa $\text{NH}_4^-$ và $\text{NO}_3^-$ và khả năng chịu mặn của nhóm vi khuẩn NOB.....	73
3.2. Nội dung 2: Tạo chế phẩm vi sinh dạng lỏng và bột .....	76
3.2.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng nuôi cấy và tối ưu hóa thành phần môi trường lên men tạo chế phẩm dạng lỏng của các chủng vi khuẩn .....	76
3.2.1.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng sinh khối ba chủng vi khuẩn...76	
3.2.1.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo chế phẩm dạng lỏng <i>Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nạp giống đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn</i> .....	79
3.2.1.3. Tối ưu hóa các thành phần môi trường nhân sinh khối của 3 chủng vi khuẩn bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RMS). ....	85
3.2.2. Tạo chế phẩm vi sinh dạng bột .....	101
3.2.2.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện sản xuất của các chủng vi khuẩn trên môi trường bán rắn .....	101
3.2.2.2. Tạo chế phẩm vi khuẩn dạng bột .....	105
3.3. Nội dung 3: Đánh giá chuyển hóa nitơ của các chủng vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản.....	108
3.3.1. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong nước nuôi tôm thẻ chân trắng (không có tôm) ở qui mô phòng thí nghiệm.....	108
3.3.1.1. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn.....	108
3.3.1.2. Đánh giá mật độ vi sinh vật khi bổ sung chế phẩm vi sinh. ....	113
3.3.2. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong bể nuôi tôm thẻ chân trắng giai đoạn ương giống ở qui mô bể xi-măng $1\text{m}^3$ .....	116
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....</b>	<b>128</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>130</b>

<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ</b>	
<b>CÔNG BỐ .....</b>	<b>150</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>151</b>

## DANH SÁCH CHỮ VIẾT TẮT

AOB	: Ammonia-Oxidizing Bacteria (vi khuẩn oxi hóa ammonia)
BC	: Bùn thu tại lồng chìm
BT	: Bùn thu tại lồng treo
BTNMT	: Bộ Tài Nguyên Môi Trường
CPVS	: Chế phẩm vi sinh
DX	: Design Expert
FCR	: Hệ số chuyển đổi thức ăn
KL	: Khuẩn lạc
MPN	: Most Probable Number ( phương pháp số có xác suất cao nhất)
MT	: môi trường
NOB	: Nitrite – Oxidizing Bacteria (vi khuẩn oxi hóa nitrite)
VKHK	: Tổng vi khuẩn hiếu khí
NT1	: Nghiệm thức 1
NT2	: Nghiệm thức 2
NT3	: Nghiệm thức 3
NT4	: Nghiệm thức 3
NT5	: Nghiệm thức 3
NTĐC	: Nghiệm thức đối chứng
NTTS	: Nuôi trồng thủy sản
PCR	: Polymerase Chain Reaction
QCVN	: Qui chuẩn Việt Nam
TAN	: Total ammonia nitrogen ( ammonia tổng cộng)
TCVN	: Tiêu chuẩn Việt Nam

## DANH SÁCH CÁC BẢNG

BẢNG	TRANG
<b>Bảng 2.1.</b> Các biến trong ma trận Plackett – Burman của 2 chủng vi khuẩn <i>B.licheniformis</i> B85 và <i>P.stutzeri</i> KL15. ....	37
<b>Bảng 2.2.</b> Ma trận thiết kế Plackett – Burman của vi khuẩn <i>B.licheniformis</i> B85...37	37
<b>Bảng 2.3.</b> Ma trận thiết kế Plackett – Burman của vi khuẩn <i>P. stutzeri</i> KL15 .....38	38
<b>Bảng 2.4.</b> Các biến trong ma trận Plackett - Burman của vi khuẩn <i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub> . .....	38
<b>Bảng 2.5.</b> Ma trận thiết kế Plackett – Burman của vi khuẩn <i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub> .....39	39
<b>Bảng 2.6.</b> Các yếu tố sử dụng trong Box – Behnken của <i>Bacillus licheniformis</i> B85 .....	39
<b>Bảng 2.8.</b> Các yếu tố sử dụng trong Box –Behnken của <i>Pseudomonas stutzeri</i> KL15 .....	40
<b>Bảng 2.9</b> Ma trận thí nghiệm Box – Behnken của <i>Pseudomonas stutzeri</i> KL15 .....40	40
<b>Bảng 2.10.</b> Các yếu tố sử dụng trong Box – Behnken của <i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub> .....41	41
<b>Bảng 2.11.</b> Ma trận thí nghiệm Box – Behnken của <i>Rhodococcus rhodochrous</i> T <sub>9</sub> 42	42
<b>Bảng 2.12.</b> Các phương pháp đánh giá chỉ tiêu chất lượng môi trường nước và vi sinh vật sử dụng trong thí nghiệm. ....	46
<b>Bảng 3.1</b> Các chỉ tiêu môi trường, mật độ vi sinh của mẫu bùn trong 12 tháng. ....47	47
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả các phản ứng sinh hóa của 13 chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....49	49
<b>Bảng 3.3</b> Kết quả định danh vùng 16S – rRNA của 13 chủng <i>Bacillus</i> sp. ....50	50
<b>Bảng 3.4.</b> Một số phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20NE...55	55
<b>Bảng 3.5.</b> Một số phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20E .....56	56
<b>Bảng 3.6.</b> Bảng kết quả định danh phân tử các nhóm vi khuẩn AOB.....57	57
<b>Bảng 3.7.</b> Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20E. ...63	63
<b>Bảng 3.8.</b> Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20NE. 64	64
<b>Bảng 3.9.</b> Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API Coryne .....	65



<b>Bảng 3.10.</b> Kết quả định danh 16 chủng vi khuẩn NOB .....	66
<b>Bảng 3.11.</b> Thiết kế ma trận Box - Behnken .....	86
<b>Bảng 3.12.</b> Kết quả phân tích ANOVA của thí nghiệm Box - Behnken.....	87
<b>Bảng 3.13.</b> Thiết kế ma trận Box - Behnken .....	91
<b>Bảng 3.14.</b> Kết quả phân tích ANOVA của thí nghiệm Box - Behnken.....	92
<b>Bảng 3.15.</b> Thiết kế ma trận Box - Behnken .....	96
<b>Bảng 3.16.</b> Kết quả phân tích ANOVA của thí nghiệm Box - Behnken.....	97
<b>Bảng 3.17.</b> Mật độ vi khuẩn sau khi nghiền và sấy .....	106

## DANH SÁCH CÁC HÌNH

<b>HÌNH</b>	<b>TRANG</b>
<b>Hình 1.1.</b> Sơ đồ chu trình chuyển hoá Nitơ trong hệ sinh thái biển.....	9
<b>Hình 1.2.</b> Vòng tuần hoàn nitơ (Boyd, 1998).....	11
<b>Hình 2.1.</b> Sơ đồ tiến trình nghiên cứu .....	26
<b>Hình 2.2.</b> Mô tả sự thải phân và thức ăn thừa (Price và Morris, 2013).....	27
<b>Hình 2.3.</b> Sơ đồ bố trí thí nghiệm.....	44
<b>Hình 3.1.</b> Cây phá hệ của các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.....	50
<b>Hình 3.2.</b> Hiệu suất chuyển hóa ammonia của 6 chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	52
<b>Hình 3.3.</b> Cây phá hệ của các chủng vi khuẩn AOB .....	58
<b>Hình 3.4.</b> Hiệu suất phân giải $\text{NH}_4^+$ của các chủng vi khuẩn.....	59
<b>Hình 3.5.</b> Cây phá hệ của các chủng vi khuẩn NOB .....	68
<b>Hình 3.6.</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NO}_2^-$ của các chủng vi khuẩn.....	70
<b>Hình 3.7.</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NO}_2^-$ của 4 chủng vi khuẩn .....	71
<b>Hình 3.8.</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NO}_3^-$ của 4 chủng vi khuẩn .....	72
<b>Hình 3.9.</b> Khả năng sống ở các nồng độ NaCl của 4 chủng vi khuẩn.....	72
<b>Hình 3.10.</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NH}_4^+$ của 4 chủng vi khuẩn.....	74
<b>Hình 3.11.</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NO}_3^-$ của 4 chủng vi khuẩn .....	74
<b>Hình 3.12.</b> Khả năng sống ở các nồng độ NaCl của 4 chủng vi khuẩn.....	75
<b>Hình 3.13.</b> Qui trình phân lập 3 chủng vi khuẩn ở nền đáy vùng nuôi tôm hùm.....	76
<b>Hình 3.14.</b> Ảnh hưởng của môi trường nhân sinh khối đến ba chủng vi khuẩn .....	77
<b>Hình 3.15.</b> Ảnh hưởng của mật độ giống đến nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn ...	78
<b>Hình 3.16.</b> Ảnh hưởng thời gian tăng sinh đến nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn .	78
<b>Hình 3.17.</b> Ảnh hưởng của tỷ lệ nạp giống đến sinh khối ba chủng vi khuẩn .....	80
<b>Hình 3.18.</b> Ảnh hưởng của thời gian đến sinh khối ba chủng vi khuẩn.....	80
<b>Hình 3.19.</b> Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh khối ba chủng vi khuẩn .....	81
<b>Hình 3.20.</b> Ảnh hưởng của pH đến sinh khối ba chủng vi khuẩn .....	82
<b>Hình 3.21.</b> Ảnh hưởng của Cacbon đến sinh khối ba chủng vi khuẩn .....	83

<b>Hình 3.22.</b> Ảnh hưởng của Nitơ đến sinh khối ba chủng vi khuẩn.....	84
<b>Hình 3.23.</b> Mặt đáp ứng giữa các yếu tố. (a) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và mật rỉ đường, (b) Mặt đáp ứng tương tác giữa mật rỉ đường và NaCl (c) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và NaCl. ....	89
<b>Hình 3.24.</b> Mặt đáp ứng giữa các yếu tố. (a) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và mật rỉ đường, (b) Mặt đáp ứng tương tác giữa mật rỉ đường và MgSO <sub>4</sub> , (c) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và MgSO <sub>4</sub> . ....	94
<b>Hình 3.25.</b> Mặt đáp ứng giữa các yếu tố. (a) Mặt đáp ứng tương tác giữa Pepton và Glucose, (b) Mặt đáp ứng tương tác giữa NaCl và Glucose, (c) Mặt đáp ứng tương tác giữa NaCl và Pepton. ....	99
<b>Hình 3.26.</b> Khảo sát các môi trường.....	101
<b>Hình 3.27.</b> Khảo sát tỷ lệ nạp giống .....	102
<b>Hình 3.28.</b> Khảo sát độ ẩm nuôi cấy .....	103
<b>Hình 3.29.</b> Khảo sát thời gian nuôi cấy .....	105
<b>Hình 3.30.</b> Khảo sát điều kiện bảo quản của vi khuẩn <i>B.licheniformis</i> .....	106
<b>Hình 3.31.</b> Khảo sát điều kiện bảo quản của vi khuẩn <i>P. stutzeri</i> KL15 .....	107
<b>Hình 3.32.</b> Khảo sát điều kiện bảo quản của vi khuẩn <i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub> .....	107
<b>Hình 3.33.</b> Chỉ tiêu pH theo dõi hàng ngày .....	108
<b>Hình 3.34.</b> Hàm lượng ammonia theo dõi hàng ngày .....	109
<b>Hình 3.35.</b> Hàm lượng nitrite theo dõi hàng ngày.....	110
<b>Hình 3.36.</b> Hàm lượng nitrate theo dõi hàng ngày .....	111
<b>Hình 3.37.</b> Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí.....	113
<b>Hình 3.38.</b> Mật độ vi khuẩn chuyển hóa ammonia .....	114
<b>Hình 3.39.</b> Mật độ vi khuẩn chuyển hóa nitrite.....	115
<b>Hình 3.40.</b> Hàm lượng TAN của các nghiệm thức.....	118
<b>Hình 3.41.</b> Hàm lượng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> của các nghiệm thức .....	119
<b>Hình 3.42.</b> Hàm lượng NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> của các nghiệm thức .....	120
<b>Hình 3.43.</b> Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí trong các nghiệm thức.....	121
<b>Hình 3.44.</b> Mật độ tổng vi khuẩn <i>Vibrio</i> trong các nghiệm thức .....	122

**Hình 3.45.** Mật độ vi khuẩn chuyển hóa ammonia trong các nghiệm thức .....124

**Hình 3.46.** Mật độ vi khuẩn chuyển hóa nitrite trong các nghiệm thức .....124

# MỞ ĐẦU

## 1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Trong 10 năm (giai đoạn 2010 - 2019) nghề nuôi tôm hùm Việt Nam đã có sự phát triển nhanh cả về quy mô số lượng lồng, thể tích lồng nuôi và sản lượng tôm hùm nuôi, từng bước phát triển theo hướng sản xuất hàng hoá, phục vụ cho xuất khẩu, góp phần tạo việc làm, nâng cao thu nhập cho người nuôi và thúc đẩy phát triển kinh tế - xã hội cho các tỉnh ven biển miền Trung. Trong giai đoạn 2010 - 2019, số lượng lồng nuôi tôm hùm tăng bình quân là 18,2%/năm, thể tích lồng nuôi tăng bình quân 16,2%, sản lượng tăng bình quân là 6,2%/năm. Ở Việt Nam, tôm hùm phân bố từ Quảng Bình tới Bình Thuận nhưng số lượng lồng nuôi và sản lượng lồng nuôi tôm hùm tập trung phát triển chủ yếu ở các tỉnh Phú Yên, Khánh Hòa. Năm 2019, tổng số lượng lồng nuôi ở 02 tỉnh (Phú Yên và Khánh Hòa) ước tính đạt 185.166 lồng, chiếm 97,8% số lượng nuôi tôm hùm Việt Nam, sản lượng đạt 2.273 tấn chiếm 95% sản lượng nuôi cả nước (trích dẫn theo Tổng cục thủy sản, 2015). Tuy nhiên, hệ lụy của tốc độ phát triển nuôi tôm công nghiệp đã dẫn đến tình trạng ô nhiễm môi trường và dịch bệnh, do vậy nghề nuôi tôm biển ở Việt Nam đã gặp những trở ngại lớn. Sản lượng tôm nuôi suy giảm, ảnh hưởng lớn đến đời sống kinh tế của nhiều dân cư và đã có nhiều dấu hiệu rõ ràng về sự suy thoái môi trường ở nhiều vùng nuôi tôm hùm (Vinh và Huang, 2009).

Theo Hoang và ctv (2009), việc cho tôm hùm ăn dựa hoàn toàn vào thức ăn tươi bao gồm cá giá trị thấp, nhuyễn thể, giáp xác và hệ số thức ăn thường vượt quá 20, nghĩa là một lượng lớn chất hữu cơ đi vào môi trường nuôi. Theo nghiên cứu của Lại Văn Hùng và Phạm Đức Hùng (2010) cho biết FCR của tôm hùm *P. ornatus* và *P. homarus* ăn bằng cá tạp/cá giá trị thấp là  $26,60 \pm 5,02$  và  $26,00 \pm 1,41$ . Hầu hết các chất thải rắn là đến từ động vật thân mềm và giáp xác, những loài này chiếm 80% thành phần của cá tạp và trọng lượng vỏ của chúng là khoảng 70% khối

lượng cơ thể tươi. Vì vậy, để sản xuất một kg *P. ornatus* và *P. homarus*, khoảng 15 kg chất thải rắn được thải ra các khu vực vùng vịnh nuôi tôm hùm. Đối với các lồng nuôi công nghiệp chất thải trong quá trình nuôi có thể chứa đến trên 45% nitơ và 22% là các chất hữu cơ khác. Các loại chất thải chứa nitơ và phốt pho ở hàm lượng cao gây nên hiện tượng phú dưỡng môi trường nước, phát sinh tảo độc trong môi trường nuôi trồng thủy sản (Theo Tổng cục thủy sản, 2015). Thức ăn nuôi tôm hùm là thức ăn tươi và phần lớn không thu gom thức ăn thừa đem vào bờ mà thải thẳng vào môi trường nước. Cụ thể, chất lượng nước nuôi tôm hùm đang có sự biến động theo chiều hướng xấu hơn. Hàm lượng  $\text{NH}_3$  hầu hết vượt tiêu chuẩn cho phép,  $\text{NO}_2$  - có xu hướng tăng ở tầng đáy. Giá trị nitơ tổng ở tầng đáy tập trung tương đối cao hơn các tầng còn lại, thấp nhất ở mức 0,1 mg/l và cao nhất là 0,2 mg/l, có sự phân tầng xảy ra đối với nhóm thông số dinh dưỡng như nitrite, nitrate, ammonia, nitơ tổng (Hoàng Thị Mỹ Hương và ctv, 2018).

Ngày 05/11/2020, Bộ Nông nghiệp và PTNT đã ban hành Quyết định số 4431/QĐ-BNN-TCTS phê duyệt Đề án phát triển nuôi và xuất khẩu tôm hùm đến năm 2025 với mục tiêu phát triển nuôi và xuất khẩu tôm hùm theo hướng bền vững và hiệu quả, bảo đảm chất lượng và an toàn thực phẩm, đáp ứng yêu cầu tiêu thụ trong nước và xuất khẩu. Cụ thể, tổng sản lượng tôm hùm nuôi đạt 3.000 tấn; giá trị kim ngạch xuất khẩu đạt 200 triệu USD; từng bước hình thành các vùng sản xuất và xuất khẩu tôm hùm trọng điểm. Cùng với sản lượng này, vấn đề liên quan đến môi trường cũng được nhấn mạnh như vùng nuôi được kiểm soát môi trường, dịch bệnh, bảo đảm an toàn thực phẩm, an toàn lao động (Tổng cục thủy sản, 2020). Ngoài ra, theo báo cáo “Tổng hợp quy hoạch nuôi tôm hùm đến năm 2020 và định hướng 2030” của Tổng cục Thủy Sản (Tổng cục thủy sản, 2015) thì việc phát triển sản lượng tôm hùm phải song song với việc quản lý môi trường nuôi tôm hùm như sử dụng thức ăn công nghiệp thay thế thức ăn tươi, nuôi tôm hùm bằng hệ thống bể trên bờ, sử dụng chế phẩm vi sinh quản lý môi trường nuôi. Do đó, việc phân lập và tuyển chọn vi sinh vật chuyên hóa ammonia, nitrite, chịu được độ mặn của biển từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài để sản xuất chế phẩm vi sinh và đánh giá hiệu quả chuyên hóa nitơ của các chủng vi sinh vật ở bể nuôi tôm thể

chân trắng giai đoạn post 5 là một giải pháp tích cực, có nhiều triển vọng và ý nghĩa thực tiễn để định hướng sản xuất chế phẩm vi sinh quản lý môi trường nuôi trồng thủy sản nước mặn trong tương lai, hạn chế đáng kể lượng chất hữu cơ thải ra môi trường, góp phần phát triển nghề nuôi thủy sản một cách bền vững. Từ những nguyên nhân trên mà đề tài "**Nghiên cứu vi khuẩn chuyển hóa nitơ trong nền đáy vùng nuôi tôm hùm (*panulirus sp.*) phục vụ nuôi trồng thủy sản**" đã được thực hiện.

## **2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI**

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có nguồn gốc từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài, Phú Yên có khả năng chuyển hóa nitơ nhằm làm cơ sở khoa học trong việc chọn lựa các chủng vi khuẩn hữu ích để tạo chế phẩm vi sinh dạng lỏng, bột và thử nghiệm hiệu quả của chế phẩm trên bể ương nuôi tôm thẻ chân trắng giai đoạn post 5.

## **3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU**

Luận án phân lập và chọn lọc các chủng vi sinh vật chuyển hóa ammonia và nitrite trong nền đáy vùng nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài, Tỉnh Phú Yên. Mẫu bùn của nền đáy được thu thập từ bùn tại vùng nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài.

Luận án nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng như môi trường, thời gian và mật độ giống, nhiệt độ, pH để tạo chế phẩm vi sinh vật dạng lỏng.

Luận án nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo chế phẩm vi sinh chuyển hóa ammonia, nitrite dạng bột như: môi trường, thời gian, độ ẩm, tỷ lệ giống và điều kiện bảo quản chế phẩm.

Luận án đánh giá khả năng chuyển hóa ammonia và nitrite trong mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng ở giai đoạn ương giống trong bể nhằm đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh.

## **4. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU**

- Phân lập, tuyển chọn và định danh các nhóm vi khuẩn chuyển hoá ammonia và nitrite từ bùn ở nền đáy vùng nuôi tôm hùm Vịnh Xuân Đài, Phú Yên.
- Tạo chế phẩm vi khuẩn dạng lỏng và chế phẩm vi khuẩn dạng bột.
- Đánh giá khả năng cải thiện chất lượng nước của nhóm vi khuẩn chuyển

hóa nitơ ở nước nuôi tôm thẻ chân trắng trong phòng thí nghiệm và mô hình nuôi ương giống tôm thẻ chân trắng giai đoạn post 5 ở bể 1m<sup>3</sup>.

## **5. Ý NGHĨA KHOA HỌC, THỰC TIỄN VÀ TÍNH MỚI CỦA ĐỀ TÀI**

### **Ý nghĩa khoa học của đề tài**

Luận án đã bổ sung những chủng vi khuẩn được thu thập từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài, Phú Yên có khả năng xử lý ammonia và nitrite, sống ở độ mặn của nước biển vào nguồn cơ sở dữ liệu khoa học chung về ứng dụng vi khuẩn hữu ích, làm tiền đề cho những nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn chuyển hóa ammonia, nitrite trong môi trường nuôi tôm nước mặn.

### **Ý nghĩa thực tiễn của đề tài**

Kết quả của luận án đã tạo được chế phẩm vi sinh dạng lỏng và bột, đánh giá được hiệu quả của chế phẩm trong bể nuôi tôm thẻ chân trắng ở giai đoạn ương giống, hỗ trợ cho nghề nuôi tôm nước lợ phát triển bền vững, góp phần cải thiện ô nhiễm môi trường vùng nuôi tôm nước lợ, làm nền tảng định hướng cho việc sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh xử lý môi trường nước nuôi tôm hùm trong tương lai.

### **Tính mới của luận án**

Luận án đã phân lập, tuyển chọn từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm khu vực Vịnh Xuân Đài, Tỉnh Phú Yên ba chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> có khả năng chuyển hóa các hợp chất ammonia, nitrite, nitrate.

Luận án đã xây dựng được quy trình phân lập ba chủng vi khuẩn từ môi trường nước mặn.

Luận án đã nghiên cứu được điều kiện nuôi cấy, thành phần môi trường lỏng và bán rắn phù hợp cho sự phát triển của ba chủng vi khuẩn làm cơ sở cho việc sản xuất chế phẩm vi sinh vật.



# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Tổng quan tình hình nuôi tôm hùm lông bè

Theo nguồn cung cấp của FAO (2014) lượng tôm hùm của các nước như Philippine, Indosesia, Australia liên tục tăng trưởng trong vòng 10 năm liên tục từ 2004-2014, từ vài chục tấn tăng lên gần 1000 tấn/năm. Hầu hết nghiên cứu về nuôi tôm hùm được thực hiện ở Nhật Bản, Úc, Mỹ, New Zealand, Mexico, Nam Phi, Ấn Độ và Việt Nam. Nguồn giống tôm hùm thả nuôi có thể từ khai thác tự nhiên hoặc nhân tạo. Do giai đoạn biến thái của ấu trùng tôm hùm quá dài, nên quá trình sản xuất giống tương đối phức tạp, chi phí cao; vì vậy nguồn giống (giai đoạn ấu trùng puerulus và tôm con nhỏ) do khai thác tự nhiên vẫn chiếm ưu thế (Võ Văn Nha, 2006; Phillips và Matsuda, 2011). Nuôi tôm hùm gai đã được nhiều nước quan tâm, nhưng chỉ có vài nước nuôi thương phẩm thành công. Trong khu vực Đông Nam Á, nuôi thương phẩm tôm hùm gai chủ yếu tập trung vào 7 loài: tôm hùm bông *P. ornatus*, tôm hùm đá *P. homarus*, tôm hùm sen *P. versicolor*, tôm hùm đỏ *P. longipes*, tôm hùm ma *P. penicillatus*, tôm hùm sỏi *P. stimpsoni* và tôm hùm tre *P. polyphagus*.

Ở Việt Nam, nghề nuôi tôm hùm gai phát triển đáng kể, phần lớn dựa vào nguồn giống tự nhiên. Nghề khai thác tôm hùm có sản lượng dưới 100 tấn mỗi năm (Thuy và Ngọc, 2004), chủ yếu từ nghề lặn và cung cấp cho thị trường nội địa. Tỉnh Phú Yên có hàng loạt vũng vịnh kín, hoặc nửa kín có mũi đá, đảo che chắn các tác động sóng và nước đủ sâu nên rất phù hợp cho nuôi tôm hùm (đầm Cù Mông, Vịnh Xuân Đài, Vũng Rô) (Tổng Phước Hoàng Sơn, 2015). Theo kết quả báo cáo của Tổng cục thủy sản (2015), sản lượng tôm hùm dao động từ 20 tấn (Bình Định) với 500 lồng, 450 tấn (Phú Yên) đến 650 tấn (Khánh Hòa). Thị xã Sông Cầu có khoảng 1.000 ha diện tích mặt biển được sử dụng để nuôi tôm hùm, sản lượng tôm hùm thương phẩm vào khoảng 400-500 tấn/năm, chiếm gần 70% sản lượng của toàn tỉnh (Tổng cục thủy sản, 2015). Nghề nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài có 3 hình thức là nuôi trong lồng treo, lồng chìm và kết hợp cả hai hình thức (Hoàng Thị Mỹ Hương

và ctv, 2018).

## **1.2. Hiện trạng ô nhiễm môi trường nước vùng nuôi tôm hùm Vịnh Xuân Đài**

Vịnh Xuân Đài thuộc thị xã Sông Cầu, tỉnh Phú Yên có diện tích mặt nước hơn 13.000 ha. Đây là vùng chứa đựng hệ sinh thái đa dạng, phong phú và là vùng nước lý tưởng phát triển nghề nuôi tôm hùm bằng lồng, bè với sản lượng hàng năm vài trăm tấn. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, tình trạng phát triển quá nhanh diện tích nuôi trồng thủy sản trên vịnh kết hợp với các hoạt động sản xuất và đời sống của con người đã gây sức ép lên môi trường vịnh Xuân Đài. Chất thải từ lồng, bè nuôi trồng thủy sản thải ra, đổ vào Vịnh. Lượng chất thải này tích tụ qua nhiều năm tháng sẽ ảnh hưởng xấu đến chất lượng nước nơi đây. Các hoạt động khai thác và đánh bắt thủy sản trên Vịnh cũng gây ô nhiễm và suy thoái môi trường. Số tàu thuyền hiện có trên Vịnh khi hoạt động thường xuyên sẽ thải ra một lượng chất thải đáng kể như váng dầu, mỡ từ động cơ. Một số hoạt động khai thác trái phép như khai thác san hô, sử dụng phương tiện khai thác hủy diệt hàng loạt, gây nguy cơ ô nhiễm biển, ô nhiễm vùng nuôi và giảm đa dạng sinh học (Bùi Hồng Long, 2001). Việc sử dụng thức ăn tươi đã làm cho môi trường nuôi ngày càng phì dưỡng, chất lượng nước giảm đi, tạo điều kiện cho dịch bệnh bùng phát (Tuan và Mao, 2005). Kết quả lấy mẫu môi trường nước vùng nuôi tôm hùm của Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản khu vực miền Trung của Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III cho thấy trầm tích tại vùng nuôi đang bị ô nhiễm hữu cơ, sulfur, hợp chất nitơ và các chất độc hại ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ...). Nuôi tôm hùm lồng sản sinh một lượng lớn chất thải vào trong môi trường nước như phân tôm, nguồn thức ăn dư thừa thối rữa bị phân huỷ, các chất tồn dư từ các loại vật liệu đầu vào như hoá chất, vôi và các loại khoáng chất diatomit, dolomit, lưu huỳnh lắng đọng, các chất độc hại có trong đất phèn  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $SO_4^{2-}$ , các thành phần chứa  $H_2S$ ,  $NH_3$ ... là sản phẩm của quá trình phân huỷ yếm khí ngập nước tạo thành. Đối với các lồng nuôi công nghiệp chất thải trong quá trình nuôi có thể chứa đến trên 45% nitơ và 22% là các chất hữu cơ khác. Các loại chất thải chứa nitơ và photpho ở hàm lượng cao gây nên hiện tượng phú dưỡng môi trường nước, phát sinh tảo độc trong môi trường nước nuôi trồng thủy sản (Tổng cục thủy sản, 2015). Chất lượng nước tại các vùng

nuôi tôm hùm cũng bị suy giảm nghiêm trọng do hàm lượng  $\text{NH}_3$  và  $\text{H}_2\text{S}$  cao trong tầng nước sát đáy và tầng đáy, được coi là những nguyên nhân chủ yếu làm cho tôm hùm chết hàng loạt (Tổng cục thủy sản, 2015). Theo Hoàng Thị Mỹ Hương và ctv (2018), chất lượng nước ở Vịnh Xuân Đài, đặc biệt là ở tầng đáy, đang diễn biến ngày càng xấu hơn. Nồng độ ammonia ( $\text{NH}_3$ ) hầu hết vượt tiêu chuẩn cho phép, đặc biệt là ở tầng đáy. Nồng độ nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) có xu hướng tăng ở tầng đáy, nồng độ nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) hầu như ổn định. Giá trị Nitơ tổng ở tầng đáy tương đối cao hơn các tầng còn lại.

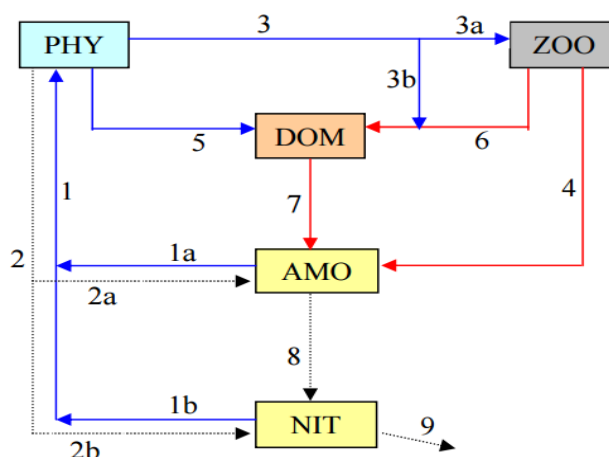
### 1.3. Vi sinh vật trong môi trường nước mặn

Môi trường nước biển ở đại dương chiếm 97,2% tổng lượng nước toàn cầu. Đại dương có độ sâu khá lớn, phần nước ở độ sâu 1000 m trở xuống chiếm 75% thể tích đại dương. Nơi sâu nhất của đại dương là 11000 m. Phần nước dưới độ sâu 100 m thường có nhiệt độ ổn định là  $3^\circ\text{C}$ . Cứ xuống sâu 10 m thì áp suất nước biển tăng 1 atm, ở nơi sâu nhất của đại dương áp suất có thể đạt tới sấp xỉ 1000 atm. Môi trường nước biển còn được đặc trưng bởi độ mặn (3,3 - 3,7%). Sự hòa trộn và chuyển động của nước biển là do thủy triều, chùng chảy, chuyển động nổi lên theo nhiệt độ, gió. (Nguyễn Lâm Dũng và ctv 2002; Nguyễn Lâm Dũng và Nguyễn Nữ Kim Thảo, 2006). Vi sinh vật sống trong môi trường nước biển chịu tác động của áp suất, có thể thấy được mối tương quan giữa vi sinh vật và áp suất. Một số vi khuẩn có khả năng tồn tại trong phạm vi dao động áp suất từ 0 - 400 atm, tuy nhiên chúng thường phát triển tốt nhất ở áp suất khí quyển. Nhiều vi khuẩn sinh trưởng tốt ở áp suất cao và được gọi là *vi sinh vật ưa áp* (barophile). *Vi sinh vật ưa áp trung bình* (moderate barophile) sinh trưởng tốt nhất ở 400 atm, tuy nhiên chúng có thể tồn tại ở 1 atm. *Vi sinh vật ưa áp cực đoan* (extreme barophile) chỉ có thể phát triển ở áp suất cao. Sự thay đổi áp suất có ảnh hưởng rất lớn tới các quá trình sinh học của vi sinh vật như phân bào, lắp ráp tiên mao, tổng hợp DNA, vận chuyển chất qua màng, sinh tổng hợp protein. Các protein hình thành kênh vận chuyển vật chất ở màng thường hoạt động có hiệu quả ở một áp suất nhất định. Ngoài ra, vi sinh vật biển còn chịu ảnh hưởng của ánh sáng, người ta chia đại dương thành 2 vùng: vùng có ánh sáng (có thể quang hợp) và vùng không có ánh sáng (không thể quang hợp).

Hầu hết chất dinh dưỡng ở đại dương xuất hiện trong vùng nước từ bề mặt tới độ sâu 300 m. Đây là vùng ánh sáng có thể xuyên tới, ở đây có sự phát triển của thực vật phù du (tảo và vi khuẩn lam). Chỉ có 1% chất hữu cơ có nguồn gốc quang tổng hợp tới được thềm đại dương, phần còn lại bị phân huỷ trong quá trình rơi xuống. Nguồn dinh dưỡng tại đáy đại dương rất hạn chế vì vậy đây là vùng tồn tại các vi sinh vật có khả năng phát triển trong điều kiện nghèo dinh dưỡng. Chu trình nitơ và lưu huỳnh cũng đóng vai trò quan trọng trong môi trường nước biển và tác động lớn đến các quá trình ở mức độ toàn cầu. Hàm lượng nitơ trong nước biển thường dao động, ở vùng nước biển chứa nồng độ oxi thấp thì sẽ xảy ra hiện tượng phản nitrate hóa (sử dụng  $\text{NO}_3^-$  và  $\text{NO}_2^-$  là chất oxi hóa và giải phóng nitơ vào khí quyển) dẫn đến làm giảm tỷ lệ N: P trong nước. Ngược lại, sự cố định nitơ xảy ra mạnh mẽ sẽ làm tăng lượng nitơ trong nước. Điều này cho thấy nitơ chứ không phải phospho đã hạn chế các hoạt động sinh học trong môi trường biển. Chu trình Cacbon ở trong môi trường biển vẫn chưa được nghiên cứu kỹ, tuy nhiên một điều rõ ràng là vi sinh vật có ảnh hưởng lớn tới chu trình cacbon ở đây. Vi sinh vật ở đại dương tác động đến chu trình cacbon toàn cầu và mối liên hệ giữa đại dương và khí quyển. Hầu hết sự biến đổi của cacbon xảy ra ở vùng nước bề mặt, chất hữu cơ không tan (POC), chất hữu cơ hòa tan (DOC) và mêtan hydrat là nguồn cacbon chính ở đại dương. Đại dương còn chứa  $\text{HCO}_3^-$  và  $\text{CO}_2$  hòa tan có nguồn gốc từ khí quyển. Do sự bổ sung chất hữu cơ từ đất liền nên số lượng vi sinh vật tổng số ở vùng bờ biển nhiều hơn là ở vùng giữa biển (Prescott, 2002; Nguyễn Lâm Dũng, 2006).

#### **1.4. Sơ đồ chu trình chuyển hóa nitơ trong hệ sinh thái biển**

Mô hình chu trình chuyển hoá Nitơ trong hệ sinh thái biển được biểu diễn trên sơ đồ hình 1.1 (Đoàn Bộ, 1997, 1998; Nguyễn Ngọc Tiến và ctv, 2011). Trong chu trình, nguyên tố Nitơ được chuyển hoá qua 5 hợp phần: thực vật nổi (Phytoplankton- sinh khối được ký hiệu là PHY), động vật nổi (Zooplankton - ZOO), chất hữu cơ hoà tan (Dissolved Organic Matter - DOM), Amoni (Amonium - AMO), Nitrit (Nitrite - NIT), Nitrat (Nitrate – NAT) (Đoàn Bộ, 1997, 1998; Nguyễn Ngọc Tiến và ctv, 2011).



**Hình 1.1.** Sơ đồ chu trình chuyển hoá Nitơ trong hệ sinh thái biển

Chú giải: PHY: Phytoplankton; ZOO: Zooplankton; DOM: Chất hữu cơ hoà tan; AMO: Amoni; NIT: Nitrat; 1... 9: Các quá trình chuyển hoá; →: Hướng chuyển hoá

### Quá trình chuyển hoá 1: Quang hợp của Phytoplankton.

Trong quá trình này dưới tác động của năng lượng ánh sáng mặt trời, Phytoplankton đã sử dụng khí CO<sub>2</sub>, nước và các muối dinh dưỡng trong đó có amoni, nitrit và nitrat của môi trường để tổng hợp chất hữu cơ. Quá trình này đã chuyển hoá nitơ vô cơ từ môi trường thành nitơ liên kết trong tế bào tảo (làm giảm AMO, NIT và NAT và làm tăng PHY). Khối lượng gia tăng của quần thể Phytoplankton trong một đơn vị thời gian thực hiện quang hợp (thường tính trong 1 ngày) chính là năng suất sinh học sơ cấp thô, một tham số quan trọng để đánh giá tiềm năng sinh học của vùng biển. Cường độ quá trình này phụ thuộc vào sinh khối quần thể Phytoplankton, nồng độ các muối dinh dưỡng amoni, nitrit, nitrat, nhiệt độ môi trường và năng lượng bức xạ quang hợp.

### Quá trình chuyển hoá 2: Hô hấp của Phytoplankton.

Trong quá trình này, một phần lượng chất hữu cơ được thành tạo trong quang hợp bị oxy hoá làm giảm sinh khối PHY, kèm theo đó là sự giải phóng một số hợp phần vô cơ trong đó có các hợp chất nitơ vô cơ, làm tăng nồng độ AMO và NIT.

### Quá trình chuyển hoá 3: Dinh dưỡng của Zooplankton.

Trong quá trình này Zooplankton sử dụng Phytoplankton làm thức ăn để tồn tại và phát triển. Cường độ sử dụng thức ăn của Zooplankton phụ thuộc vào hàm lượng thức ăn (PHY), sinh khối và bản chất quần thể Zooplankton. Quá trình

chuyển hoá này làm giảm sinh khối quần thể Phytoplankton, trong đó phần thức ăn thực sự được sử dụng vào đồng hoá sẽ làm tăng sinh khối quần thể Zooplankton, phần không sử dụng sẽ trở lại môi trường và làm tăng sinh khối chất hữu cơ (DOM).

**Quá trình chuyển hoá 4: Hô hấp của Zooplankton.**

Hô hấp của Zooplankton là quá trình ngược lại với đồng hoá của nó. Trong quá trình này phần vật chất (năng lượng) đã lấy được do đồng hoá thức ăn lại bị oxy hoá để giải phóng năng lượng và Zooplankton sử dụng năng lượng này để tồn tại và phát triển. Cơ chế hô hấp của Zooplankton được thể hiện đơn giản qua phản ứng sau:  $C_nH_{2n}O_n + nO_2 = nCO_2 + nH_2O + Q$ , kèm theo năng lượng được giải phóng là các sản phẩm vật chất được thải ra môi trường dưới dạng các sản phẩm bài tiết, trong đó có amoni. Như vậy, hô hấp của Zooplankton đã làm giảm sinh khối ZOO và tăng nồng độ AMO. Cường độ quá trình này phụ thuộc chủ yếu vào nhiệt độ môi trường.

**Quá trình chuyển hoá 5 và 6: Chết tự nhiên của quần thể Phytoplankton và Zooplankton.**

Quá trình này làm giảm sinh khối các quần thể và làm tăng sinh khối chất hữu cơ (DOM). Đối với PHY, cường độ quá trình chết tự nhiên bị giới hạn bởi nồng độ các muối dinh dưỡng (AMO và NIT), đối với ZOO - bị giới hạn bởi hàm lượng thức ăn (PHY).

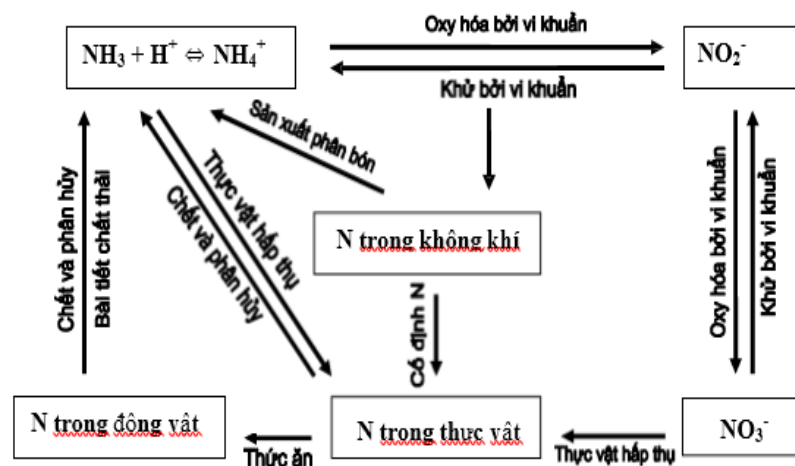
**Quá trình chuyển hoá 7: Khoáng hoá chất hữu cơ.**

Phân huỷ và khoáng hoá chất hữu cơ trong biển (các xác chết, các sản phẩm dư thừa trong các hoạt động sống) là một tập hợp các quá trình lý-hoá-sinh học rất phức tạp, có sự tham gia của các sinh vật (chủ yếu là vi sinh vật phân giải) và các chất như  $O_2$ , nước. Trong quá trình phân huỷ, năng lượng còn lại trong chất hữu cơ được giải phóng và các sinh vật phân giải sử dụng năng lượng này để tồn tại và phát triển. Sản phẩm cuối cùng của quá trình phân huỷ và khoáng hoá chất hữu cơ là các chất vô cơ được hoàn lại cho môi trường. Cường độ quá trình này phụ thuộc bản chất chất hữu cơ, lượng các sinh vật phân giải và nhiều điều kiện phân giải, trong đó quan trọng hơn hết là nhiệt độ môi trường và trực tiếp làm tăng nồng độ của chi

riêng AMO. Đối với chu trình Nitơ, các sản phẩm vô cơ được giải phóng trong quá trình phân huỷ và khoáng hóa là amoni, nitrit, nitrat.

### 1.5. Các quá trình chuyển hoá nitơ và vai trò các nhóm vi khuẩn tham gia chuyển hóa

Trong nước nitơ tồn tại ở nhiều dạng khác nhau như ở môi trường trên cạn như nitơ phân tử, các hợp chất nitơ vô cơ và các hợp chất hữu cơ phức tạp có trong các cơ thể sống (protein, acid amin).



**Hình 1.2.** Vòng tuần hoàn nitơ (Boyd, 1998)

Khi cơ thể sinh vật chết đi, các chất hữu cơ chứa nitơ sẽ bị thổi rửa và amôn hoá dưới tác dụng của các vi sinh vật thành  $\text{NH}_3$  hay  $\text{NH}_4^+$ . Dạng  $\text{NH}_4^+$  sẽ bị chuyển hoá thành dạng  $\text{NO}_3^-$  nhờ nhóm vi khuẩn nitrate hoá. Các hợp chất nitrate lại được chuyển hoá thành dạng nitơ phân tử do tác dụng của các vi khuẩn phản nitrate hoá. Khí nitơ phân tử sẽ được cố định lại dưới dạng hợp chất hữu cơ nhờ nhóm vi khuẩn cố định đạm. Các quá trình trên kết hợp lại tạo ra vòng tuần hoàn nitơ trong thủy vực. Trong tất cả các quá trình này đều có sự tham gia của các nhóm vi khuẩn khác nhau. Nếu sự hoạt động của một nhóm vi khuẩn nào đó ngừng trệ, toàn bộ tiến trình chuyển hoá nitơ sẽ bị ảnh hưởng gây tích tụ một số hợp chất nitơ trong thủy vực có thể gây nên sự biến đổi chất lượng nước làm ảnh hưởng đến đời sống các thủy sinh vật sống trong thủy vực đó (Kiều Hữu Anh và Ngô Tự Thành, 1985).

#### **Quá trình amôn hoá**

Quá trình amôn hóa protein là quá trình phân huỷ các hợp chất hữu cơ chứa

nito, giải phóng  $\text{NH}_3$  do nhiều vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí gây ra như vi khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn với nhiệt độ tối ưu là từ  $25 - 30^\circ\text{C}$ , quá trình ammon hóa protein giữ vai trò quan trọng trong việc chuyển nito từ dạng khó hấp thu sang dạng muối amôn mà thực vật dễ hấp thụ, giúp làm sạch các thủy vực. Nhờ quá trình này mà  $\text{NH}_3$  luôn luôn được phục hồi, cung cấp dinh dưỡng cho thực vật thủy sinh. Ngoài protein và urê, nhiều loài vi sinh vật có khả năng amôn hoá kitin là một hợp chất carbon có chứa gốc amin. Kitin là thành phần của vỏ ngoài các loài giáp xác và côn trùng sống trong nước. Hàng năm, kitin được tích lũy lại trong thủy vực với một lượng đáng kể. Nhóm vi sinh vật phân hủy kitin có khả năng tiết ra enzyme kitinase và kitobiase phân hủy phân tử kitin thành các gốc đơn phân tử. Sau đó gốc amin sẽ được amôn hoá thành  $\text{NH}_3$  (Kiều Hữu Anh và Ngô Tự Thành, 1985).

#### ***Giai đoạn nitrite hoá***

Vi khuẩn nitrate hoá thực hiện quá trình oxy hoá  $\text{NH}_4^+$  tạo thành  $\text{NO}_2^-$  bằng oxy không khí và tạo ra năng lượng theo phương trình:  $\text{NH}_4^+ + 3/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}^+ + \text{Q}$ . Giai đoạn này là giai đoạn oxy hoá  $\text{NH}_4^+$  thành  $\text{NO}_2^-$  được gọi là giai đoạn nitrite hoá. Năng lượng này được vi khuẩn sử dụng để đồng hoá  $\text{CO}_2$  thành carbon hữu cơ (sinh khối vi khuẩn). Nhóm vi khuẩn nitrite hoá bao gồm 4 giống khác nhau: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosobrio*, *Nitrozolobus* và *Nitrospira* (Watson và ctv, 1989; Bock and Koops, 1992; trích dẫn bởi Herber, 1999).

#### ***Giai đoạn nitrate hoá***

$\text{NO}_2^-$  tạo thành trong giai đoạn nitrite hoá sẽ tiếp tục bị oxy hoá thành  $\text{NO}_3^-$  nhờ một nhóm vi khuẩn khác theo phương trình:  $\text{NO}_2^- + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{Q}$ . Đây là giai đoạn oxy hoá  $\text{NO}_2^-$  thành  $\text{NO}_3^-$  được gọi là giai đoạn nitrate hoá (Cole, 1994). Nhóm vi khuẩn thực hiện nitrate hoá này bao gồm 3 giống: *Nitrobacter*, *Nitrospira* và *Nitrococcus* (Watson và ctv 1989; Bock and Koops, 1992). Quá trình nitrate hoá là một khâu quan trọng trong vòng tuần hoàn nito trong thủy vực. Quá trình này có tầm quan trọng trong quản lý chất lượng nước trong nuôi trồng thủy sản. Khi quá trình này xảy ra mạnh chất thải amôn độc hại sẽ được chuyển hoá nhanh sang dạng



nitrate không độc đối với sự sống và sinh trưởng của tôm cá (Kiều Hữu Anh và Ngô Tự Thành, 1985; Lê Xuân Phương, 2007). Người đầu tiên nghiên cứu về vi khuẩn Nitrate hóa và hoạt động sinh lý của chúng là nhà khoa học Nga Winogradsky. Năm 1889, ông chứng minh vi khuẩn nitrate hóa là những loài vi sinh vật dinh dưỡng vô cơ bằng tổng hợp hóa học. Đây là nhóm vi khuẩn hiếu khí tự dưỡng hoá năng và bao gồm hai nhóm nhỏ tham gia vào hai giai đoạn của quá trình này.

### ***Quá trình khử Nitrate***

Quá trình vi sinh vật khử Nitrate (hoặc Nitrite) đến Nitơ phân tử kèm theo sự oxy hóa các chất hữu cơ để giải phóng CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O, được gọi là quá trình phản Nitrate hóa (hoặc khử Nitrate). Quá trình phản Nitrate có thể xảy ra ở điều kiện kỵ khí và hiếu khí, nhưng đặc biệt mạnh mẽ khi không có mặt oxy của không khí. Phương trình tổng quát như sau:  $10(H) + 2H^+ + 2NO_3^- \rightarrow N_2 + 6H_2O$ . Vi khuẩn phản nitrate hóa là nhóm vi khuẩn phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Chúng là các loài kỵ khí không bắt buộc, hoạt động mạnh trong môi trường trung tính hoặc hơi kiềm và kỵ khí. Những loài vi khuẩn phản nitrate hóa thường là: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Thiobacillus*, *Paracoccus* (Lương Đức Phẩm và ctv, 1998; Nguyễn Đức Lượng và ctv, 2006).

## **1.6. Đặc điểm của các nhóm vi khuẩn tham gia quá trình chuyển hóa Nitơ**

### **1.6.1. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn *Bacillus***

Vi khuẩn *Bacillus* là nhóm trực khuẩn, tế bào hình que và thẳng, kích thước 0,5-2,5 x 1,2-10 μm, di động bằng chu mao, là vi khuẩn Gram dương, catalase dương tính. Nhóm vi khuẩn này thường tìm thấy trong môi trường có độ pH biến động cao, sinh trưởng dưới điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc, sử dụng khí oxy làm chất nhận electron khi trao đổi khí trong quá trình trao đổi chất. Thuộc chi *Bacillaceae*, đứng riêng rẽ hoặc kết thành chuỗi hay thành sợi. Chúng có khả năng tạo ra bào tử khi xảy ra các điều kiện khắc nghiệt như thiếu chất dinh dưỡng, nhiệt độ cao. Bào tử có màng nhiều lớp, chứa ít nước tự do và do đó có thể chịu đựng tốt với nhiều tác động bất lợi có thể làm chết các tế bào dinh dưỡng (Gorden, 1973; Lương Đức Phẩm, 1998). Bào tử có tính kháng nhiệt cao, kháng bức xạ, kháng hóa chất, kháng áp suất thẩm thấu. Khi gặp điều kiện thuận lợi có thể nảy

mầm, phát triển thành tế bào sinh dưỡng. Thường thì người ta quan sát thấy tập đoàn của giống sinh vật này rất rộng lớn, có hình dạng bất định và đang phát triển lan rộng. Một đặc điểm nữa của nhóm vi khuẩn *Bacillus* là có bao nhầy (giác mạc), có cấu tạo polypeptit, giúp cho vi khuẩn *Bacillus* có khả năng chịu được các điều kiện khắc nghiệt là do bao nhầy có khả năng dự trữ thức ăn (Lương Đức Phẩm, 1998).

Tất cả các loài thuộc chi *Bacillus* đều có khả năng dị dưỡng và hoại sinh nhờ sử dụng các hợp chất hữu cơ đa dạng như đường, acid amin, acid hữu cơ. Hầu hết đều là loài ưa nhiệt trung bình với nhiệt độ tối ưu là 30-45°C, nhưng cũng có nhiều loài ưa nhiệt với nhiệt độ tối ưu là 65°C. Đa số *Bacillus* sinh trưởng ở pH = 7, một số phù hợp với pH= 9-10 như *Bacillus alcalophilus*, hay có loại phù hợp với pH =2-6 như *Bacillus acidocaldrius*. Các loài vi khuẩn dị dưỡng hoại sinh thuộc giống *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*,...) có khả năng phân hủy các hydratcarbon thành những phần nhỏ hơn, tạo ra các sản phẩm của quá trình trao đổi chất như các khí (NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>...), acid formic, acid acetic, acid propionic, acid béo, acid lactic...các chất khoáng và sinh khối mới của vi sinh vật (Tăng Thị Chính và Đặng Đình Kim, 2007). Ngoài ra *Bacillus subtilis* còn làm sạch môi trường nhờ khả năng sinh các enzyme (protease, amylase, cellulose, kitanase, lipase) phân hủy các hợp chất hữu cơ và kiểm soát sự phát triển quá mức của các vi sinh vật gây bệnh do cơ chế cạnh tranh nguồn dinh dưỡng, giữ cho môi trường luôn ở trạng thái cân bằng sinh học (Tăng Thị Chính và Đặng Đình Kim, 2007). Vi khuẩn *Bacillus* có tác dụng cạnh tranh tốt với các vi khuẩn khác để tái tạo lại hệ vi khuẩn đường ruột (Lương Đức Phẩm và Hồ Sưởng, 1978). Nhóm vi khuẩn *Bacillus* là G (+) thường phân hủy vật chất hữu cơ thành CO<sub>2</sub> tốt hơn nhóm G (-) mà NH<sub>3</sub> luôn được phục hồi, cung cấp dinh dưỡng cho thực vật thủy sinh (Kiều Hữu Anh và Ngô Tự Thành, 1985).

*Bacillus licheniformis* là một vi khuẩn gram dương, ưa nhiệt, kỵ khí tùy nghi. Nhiệt độ phát triển tối ưu là khoảng 50°C và có thể tồn tại ở nhiệt độ cao hơn. Nhiệt độ tối ưu cho sự tiết enzyme là 37 °C, có thể tồn tại ở dạng bào tử để chống lại môi trường khắc nghiệt, hoặc ở trạng thái sinh dưỡng khi điều kiện tốt, hoạt động tốt ở pH từ 8-10 (Logan và ctv, 2015).

### 1.6.2. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn *Rhodococcus*

Phát triển dưới dạng que hoặc khuẩn ty cơ chất phân nhánh. Ở tất cả các chủng, chu trình sống đều bắt nguồn từ giai đoạn hình cầu hoặc que ngắn. Bằng cách phân đoạn, các tế bào hình cầu sẽ tạo thành dạng que rồi dạng sợi, sợi phân nhánh và hệ sợi. Một số chủng còn tạo khuẩn ty khí sinh phân nhánh hoặc bó sợi. Chúng không có khả năng chuyển động cũng như không hình thành bào tử hay nội bào tử. Vi khuẩn gram dương, hiếu khí, hóa dị dưỡng hữu cơ, catalase dương tính. Hầu hết các chủng đều mọc tốt trên các môi trường tiêu chuẩn ở 30°C, số khác cần thiamin cho sinh trưởng. Khuẩn lạc có thể sần sùi hoặc trơn nhẵn, có màu vàng sẫm, kem, vàng, vàng da cam, đỏ hoặc không màu. Nhạy cảm với lysozyme, không phân hủy được casein, cellulose, chitin, elastin hay xylan. Có thể sử dụng được rất nhiều loại hợp chất hữu cơ làm nguồn cacbon và nguồn năng lượng (Nguyễn Lâm Dũng và Nguyễn Kim Nữ Thảo, 2006). *R.rhodochrous* có thể đồng hóa nguồn C hữu cơ và vô cơ, nó có thể sử dụng các loại monosaccharide, các disaccharide, đường 5C, polysaccharide đặc biệt là glucose là nguồn tốt nhất. Để nuôi cấy *R. rhodochrous* thường sử dụng peptone, cao nấm men, casein. Nhiệt độ tối đa của *R. rhodochrous* là 45 - 55°C, nhiệt độ tối thiểu là 5 - 15°C. Khoảng nhiệt độ tối thích cho sự phát triển của *R. rhodochrous* 33 - 35°C. (Nguyễn Lâm Dũng và Nguyễn Kim Nữ Thảo, 2006).

### 1.6.3. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn *Pseudomonas*

Vi khuẩn *Pseudomonas* thường là vi khuẩn Gram âm (-), hình que. Có chiên mao ở cực nên có khả năng di chuyển tốt trong nước, không có khả năng tạo bào tử. Vi khuẩn *Pseudomonas* là vi khuẩn sống tự do, chúng hiện diện khắp nơi như trong môi trường đất, trong nước, thực vật, động vật, một số làm hư thực phẩm. Chúng có khả năng hô hấp hiếu khí hay kỵ khí trong môi trường không có oxi. Nhiệt độ thuận lợi để chúng phát triển là từ 30°C – 37°C (Ngô Thanh Phong, 2012). *Pseudomonas* sp. là nhóm vi khuẩn đa dạng, phổ biến và có vai trò quan trọng trong chu trình chuyển hoá carbon và nitơ nhờ vào hệ enzyme phong phú (Spiers và ctv, 2000).

Vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* là một vi khuẩn Gram âm, hình que, không hình thành bào tử, có phản ứng dương tính với oxydase và catalase, có thể phát triển

tối ưu ở nhiệt độ 35°C, khoảng nhiệt độ phù hợp là 4 - 44°C, phát triển tốt nhất ở nồng độ muối NaCl 2%, khoảng nồng độ muối mà vi khuẩn có thể chịu được là 1-5%, vi khuẩn phát triển tốt nhất ở pH 7 (Van Niel và Allen, 1952; Stanier và ctv, 1966). Vi khuẩn *P. stutzeri* thường sử dụng các hợp chất hữu cơ làm chất cho điện tử của nó, một số trong số đó bao gồm: glucose, lactate, acetate, succinate, pyruvate, sucrose và fumarate và sẽ nhận điện tử bằng cách sử dụng oxy, nếu nó ở trong điều kiện hiếu khí, hoặc nitrat, nếu nó ở trong điều kiện kỵ khí. (Chakraborty và ctv, 2017).

#### **1.6.4. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn *Stenotrophomonas***

*Stenotrophomonas* là một chi vi khuẩn Gram âm, bao gồm ít nhất mười loài. Các nguồn chứa *Stenotrophomonas* chính là đất và thực vật (Ryan và ctv, 2009). Các loài *Stenotrophomonas* bao gồm từ sinh vật đất thông thường (*S. nitritireducens*) đến các mầm bệnh cơ hội ở người (*S. maltophilia*), phân loại phân tử của chi vẫn chưa rõ ràng. Loài phổ biến nhất, *S. maltophilia* rất linh hoạt và có thể có lợi cho sự phát triển và sức khỏe của cây trồng, có thể được sử dụng trong nông nghiệp, kiểm soát sinh học, xử lý sinh học và các chiến lược xử lý thực vật cũng như sản xuất các phân tử sinh học có giá trị kinh tế. *Stenotrophomonas* cũng có thể là phytopathogenic không giống như các chi có quan hệ họ hàng gần *Xylella* và *Xanthomonas* (Kubra và ctv, 2016). Các thành viên của chi *Stenotrophomonas* có vai trò sinh thái quan trọng trong chu trình nitơ và lưu huỳnh. Các loài *Stenotrophomonas*, đặc biệt là *S. maltophilia* và *S. rhizophila*, thường được tìm thấy cùng với các loài thực vật, chẳng hạn như dưa chuột, cải dầu, khoai tây, đậu tây, cỏ linh lăng, hướng dương, ngô, gạo, lúa mì, các loại cỏ dại khác nhau, liễu và dương. *Stenotrophomonas* có thể được phân lập từ thân rễ hoặc từ các mô bên trong thực vật, đặc biệt là từ các mô mạch của rễ và thân. *Stenotrophomonas* spp. có thể định cư một cách hiệu quả các chất sinh học khác nhau như thực vật, con người và môi trường biển. *Stenotrophomonas* spp. tạo ra hormone tăng trưởng thực vật indole - 3 - acetic acid (IAA), nó cũng có thể thúc đẩy sự phát triển của thực vật do sự cố định nitơ và quá trình oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố, do đó cung cấp sulphat cho cây. Các chủng *S. maltophilia* có tiềm năng thủy phân cực kỳ cao; chúng tạo ra nhiều

enzyme như protease, chitinase, glucanase, DNase, RNases, lipase (Ryan và ctv, 2009).

#### 1.6.5. Đặc điểm sinh học của các nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ khác

*Providencia stuartii* là một loại trực khuẩn Gram âm thường được tìm thấy trong đất, nước và nước thải. *P. stuartii* là loài phổ biến nhất trong số 5 loài được tìm thấy trong chi *Providencia*, với *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rustigianii*, *P. heimbachae*. *Providencia stuartii* có thể được ủ ở 37 ° C trong thạch dinh dưỡng hoặc môi trường dinh dưỡng. *P. stuartii* là nó di chuyển qua lông roi, không tạo bào tử, lên men không lactose, catalase dương tính và oxidase âm tính. Nó cũng có thể phát triển trong điều kiện yếm khí và trên Simmon's Citrate Agar (Edward Charbek và Nirav Patel, 2019).

*Alcaligenes faecalis* là một loài vi khuẩn Gram âm, hình que thường được tìm thấy trong môi trường. Ban đầu nó được đặt tên cho phát hiện đầu tiên trong phân, nhưng sau đó được tìm thấy phổ biến trong đất, nước và môi trường liên quan đến con người. Nó dương tính với xét nghiệm oxidase và xét nghiệm catalase, nhưng âm tính với xét nghiệm nitrat reductase. Vi khuẩn phân giải urê, tạo ra amoniac làm tăng độ pH của môi trường (Huang, 2020).

*Nitrosomonas* là một trong 5 giống vi khuẩn oxy hóa ammonium (AOB) gồm: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* và *Nitrosospira*. Tất cả các vi sinh vật này đều giống nhau về mặt sinh lý-sinh hóa nhưng khác nhau về mặt đặc điểm hình thái học và cấu trúc học (Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002). *Nitrosomonas* thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, đều có hình que nhưng các tế bào vi khuẩn khác nhau có hình dạng và kích thước khác nhau. Có 3 hình dạng cơ bản được xác định: hình que rất ngắn rộng 0,8 μ m và dài 1 - 2 μ m, hình que rộng 1 - 1,3 μ m và dài 2 - 2,5 μ m, hình dạng thứ ba là những tế bào rộng 1,2 μ m và dài 2 - 2,5 μ m (Mecklejohn, 1950; Engel và Alexander, 1958). Vi khuẩn *Nitrosomonas* là nhóm vi khuẩn tự dưỡng hoá năng và hiếu khí bắt buộc. Các loài thuộc giống *Nitrosococcus* chỉ có thể được tìm thấy trong môi trường nước mặn (Bollmann và ctv, 2002; Grommen và ctv, 2004).

*Nitrobacter* là thuộc nhóm vi khuẩn tự dưỡng hoá năng vô cơ và hiếu khí

bắt buộc, nhận nguồn năng lượng từ quá trình oxy hoá  $\text{NO}_2^-$  thành  $\text{NO}_3^-$ , phân bố rộng, được phát hiện trong nhiều môi trường khác nhau như đất, nước ngọt, nước biển, nước thải công nghiệp và nông nghiệp (Watson và ctv, 1989). Giống *Nitrobacter* gồm hai loài đã được phát hiện, đó là loài *N. agilis* do Wignogradsky phân lập từ đất năm 1890. Loài *N. hamburgensis* do Bock và ctv. phát hiện năm 1893 (Watson và ctv, 1989). *Nitrospira* phân bố trong môi trường nước mặn (Grommen, 2004) có hình que dài và rất mảnh, chiều rộng 0,3 - 0,4  $\mu\text{m}$  và dài 2,7 - 6,5  $\mu\text{m}$ . Trong 4 giống thuộc nhóm vi khuẩn nitrite hóa chỉ có *Nitrobacter* được chứng minh có nhiều trong đất và bùn (Schmidt và Belser 1994; Degrange và Bardin, 1995).

## **1.7. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn**

### **1.7.1. Nguồn Cacbon**

Cacbon tham gia trong hầu hết các cấu trúc của tế bào, từ tế bào chất đến thành tế bào, từ phân tử enzyme đến acid nucleic. Vi sinh vật có khả năng sử dụng nhiều hợp chất hữu cơ để làm nguồn cacbon cho quá trình sinh trưởng và phát triển. Nguồn cacbon vi sinh vật sử dụng được rất phong phú, nó có thể sử dụng được các loại cacbon như monosaccaride, các disaccaride, đường 5C, các polysaccaride, mật rỉ đường, tinh bột, cellulose. Chính vì thế nguồn C là nguồn nguyên liệu chính được sử dụng cho việc nhân sinh khối vi sinh vật (Trần Thị Thanh, 2000).

### **1.7.2. Nguồn Nito**

Bên cạnh đó, nguồn Nito là yếu tố dinh dưỡng quan trọng thứ hai sau carbon, tạo ra các amino acid cần thiết cho quá trình chuyển hóa protein của tế bào vi khuẩn. Vi sinh vật có thể sử dụng nguồn Nito vô cơ hoặc hữu cơ như amoni, nitrate, glutamate, asparagin, alanine, cao nấm men, bột bắp, bột đậu nành, peptone, cao thịt. (Trần Thị Thanh, 2000).

### **1.7.3. Nguồn khoáng và vitamin**

Vi khuẩn cần được cung cấp các nguyên tố khoáng như P, S, Ca, K, Fe, Mn... để phát triển. Các nguyên tố này có thể được cung cấp dưới dạng muối để tạo các ion khoáng chất trong môi trường hoặc cũng có thể cung cấp dưới dạng trực tiếp với đúng lượng cần thiết để chúng tham gia vào quá trình chuyển hóa các chất giúp cho

quá trình trao đổi chất của vi khuẩn được thuận lợi (Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002). Tuy nhiên các nguyên tố khoáng chỉ giới hạn những nồng độ thích hợp, nếu vượt qua giới hạn đó thì sẽ giảm hiệu suất lên men. Vitamin được bổ sung trong quá trình lên men thông qua các nguồn nguyên liệu giàu vitamin như mật rỉ hay bột bắp, bã đậu nành (Trần Thị Thanh, 2000; Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002).

#### **1.7.4. Mật độ giống**

Mật độ giống ảnh hưởng không nhỏ đến sự phát triển của vi khuẩn. Nếu tỷ lệ nạp giống quá thấp sẽ kéo dài thời gian nuôi cấy, dễ gây tạp nhiễm, hiệu suất thu hồi sinh khối thấp. Nếu tỷ lệ nạp giống quá cao, thời gian nuôi cấy được rút ngắn nhưng lượng sinh khối không cao do vi khuẩn phát triển quá nhanh làm nguồn thức ăn sớm bị cạn kiệt, đồng thời chúng còn sinh ra một số hợp chất gây ức chế quá trình sinh trưởng. Do đó, cần chọn được mật độ giống ban đầu phù hợp để quá trình nhân sinh khối vi sinh vật được diễn ra thuận lợi nhất (Trần Thị Thanh, 2000).

#### **1.7.5. Thời gian nuôi cấy**

Thời gian là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh khối, xác định thời điểm thu sinh khối của các vùng vi khuẩn nhiều nhất có ý nghĩa thực tế trong việc tạo chế phẩm sinh học (Nguyễn Đức Lượng và ctv, 2006).

#### **1.7.6. Nhiệt độ**

Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng sâu sắc đến các hoạt động trao đổi chất cũng như các quá trình sống của tế bào vi khuẩn. Mỗi vi khuẩn phát triển trong một khoảng nhiệt độ nhất định. Khi nhiệt độ vượt quá mức chịu đựng thì quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn bị ức chế, số lượng tế bào giảm và tỷ lệ chết của tế bào tăng cao (Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002).

#### **1.7.7. Độ pH**

Từng loài vi khuẩn có thể phát triển được trong các môi trường pH khác nhau, tuy nhiên vẫn còn phụ thuộc vào đặc điểm chủng và đặc điểm của môi trường phân lập ra chủng đó. Nếu điều kiện pH không thích hợp sẽ gây ức chế sự phát triển của vi khuẩn. (Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002).

#### **1.7.8. Động học của quá trình vi sinh vật**

Nghiên cứu động học vi sinh vật là nghiên cứu tốc độ sinh trưởng của tế

bào và tốc độ tạo thành sản phẩm, cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến môi trường xung quanh đến các tốc độ này, và yếu tố ảnh hưởng này sẽ được khảo sát trong thực tế để xác định thông số cho từng giai đoạn của quá trình (Lương Đức Phẩm, 1998).

## **1.8. Sơ lược về ma trận Plackett - Burman và Box - Behnken**

### **1.8.1. Giới thiệu phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM)**

Phương pháp bề mặt đáp ứng bao gồm các kỹ thuật toán học và thống kê để mô hình hóa và phân tích các vấn đề như thiết kế, phát triển, tối ưu quy trình hay sản phẩm. RSM được ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực khác nhau nhất là trong các quy trình công nghiệp có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm đầu ra. Trong RSM, một hàm đáp ứng phụ thuộc vào nhiều biến (các yếu tố đầu vào) khác nhau có thể được biểu diễn gần đúng dưới một đa thức có dạng:  $y = f(x)\beta + \varepsilon$ , trong đó là hàm mục tiêu,  $x = x_1, x_2, \dots, x_k$  là các yếu tố đầu vào,  $\beta$  là các hệ số ứng với các biến, và  $\varepsilon$  là sai số (Myers và ctv, 1989).

RSM có rất nhiều công cụ thiết kế tối ưu: các thiết kế bậc một như thiết kế hai cấp độ ( $2^k$  Factorial Design), thiết kế Plackett - Burman; các thiết kế bậc hai như thiết kế ba cấp độ ( $3^k$  Factorial Design), thiết kế điểm trung tâm CCD, thiết kế BBD. Tùy vào mục đích của từng nghiên cứu, đặc điểm thiết kế và điều kiện tiên hành mà lựa chọn từng công cụ thiết kế phù hợp (Nguyễn Cảnh, 2004).

### **1.8.2. Ma trận Plackett - Burman**

Plackett và Burman (1946) đã đưa thiết kế Plackett - Burman vào thực nghiệm. Trong thiết kế này chúng cho phép sử dụng  $N$  thí nghiệm để đánh giá  $N - 1$  ảnh hưởng chính. Thiết kế dựa trên ma trận Hadamard, trong đó số lượng thí nghiệm là bội số của 4, tức là  $N = 4, 8, 12, 16, \dots$  ( $N$  là số các nghiệm thức). Thiết kế này thích hợp cho việc nghiên cứu lên đến  $k = (N - 1) / (L - 1)$  nhân tố, trong đó  $L$  là số lượng các mức,  $k$  là số nhân tố. Thí nghiệm Plackett - Burman là dạng đặc biệt của thí nghiệm hai mức riêng. Trong nghiên cứu một quá trình hay một đối tượng thường có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình đó. Số lượng các yếu tố ảnh hưởng đến hàm mục tiêu không ít. Mục đích thực nghiệm sàng lọc được thiết kế để giảm bớt số thí nghiệm cần tiến hành bằng cách chỉ ra các biến có ảnh hưởng mạnh nhất đến



hàm mục tiêu. Căn cứ vào đó chúng ta có thể chọn ra một số ít biến để tiến hành thí nghiệm tối ưu hóa. Thiết kế này sử dụng hai cấp độ cho mỗi yếu tố, mức độ cao hơn được kí hiệu là “ + ” và thấp “ - ”, mỗi mức độ được sắp xếp thử nghiệm tính theo chu kì (Plackett & Burman, 1946; Nguyễn Cảnh, 2004).

### **1.8.3. Ma trận Box-Behnken (BBD)**

Ma trận BBD là một ma trận có 3 mức độ không đầy đủ được phát triển bởi Box và Behnken vào năm 1960. Ma trận BBD cho phép: ước lượng các tham số của mô hình bậc hai, xây dựng các thiết kế liên tiếp, phát hiện thiếu sót của mô hình dữ liệu, và sử dụng các khối thiết kế trực giao (Ferreira và ctv, 2007).

Ma trận BBD được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu công nghiệp vì có tính kinh tế. Số thí nghiệm phải thực hiện trong thiết kế BBD là  $N = 2k(k - 1) + C_0$ , ít hơn nhiều so với thiết kế đầy đủ 3 mức độ có  $N = 3^k$  hay thiết kế CCD có  $N = 2^k + 2k + C_0$  (với  $k$  là số yếu tố đầu vào và  $C_0$  là số thí nghiệm tại tâm) khi có nhiều yếu tố đầu vào (Ferreira và ctv, 2007). Đặc biệt BBD không chứa thí nghiệm mà các yếu tố đầu vào đồng thời ở giá trị cao nhất hoặc thấp nhất. Vì vậy, thiết kế này tránh được những thí nghiệm ở các điều kiện đặc biệt này có thể dẫn đến những kết quả không mong muốn. Mỗi yếu tố được đưa vào thí nghiệm với 3 mức độ là cao (+1), thấp (-1) và ở giữa (0). Thí nghiệm được thực hiện với tất cả các yếu tố ở mức độ 0 được gọi là thí nghiệm tại tâm (Ferreira và ctv, 2007).

## **1.9. Các yếu tố ảnh hưởng đến môi trường nước nuôi tôm thẻ chân trắng**

### **1.9.1. Ammonia tổng cộng (TAN - Total Ammonia Nitrogen)**

Ammonia có thể chiếm tới 40 – 90% các chất bài tiết nitơ (Vũ Thế Trụ, 1995) và rất độc đối với tôm, khi có nồng độ trong ao/bể khoảng 1 mg/L có khả năng gây hiện tượng tôm chết, khi nồng độ lớn hơn 0,1 mg/L sẽ ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của tôm. Do đó, cần duy trì nồng độ  $\text{NH}_3$  nhỏ hơn 0,1 mg/L để an toàn cho tôm nuôi (Boyd, 1998). Trong ao/bể nuôi thủy sản,  $\text{NH}_3$  có được từ các quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ có chứa N, nhờ các vi khuẩn hiếu khí và yếm khí.  $\text{NH}_3$  (dạng tự do) hòa tan trong nước tạo thành  $\text{NH}_4^+$  (dạng ion) cho đến khi cân bằng. Khi pH tăng, sự chuyển đổi từ  $\text{NH}_4^+$  sang  $\text{NH}_3$  cũng tăng, gây độc cho tôm.  $\text{NH}_3$  có độc tính cao hơn  $\text{NH}_4^+$  vì  $\text{NH}_3$  không mang điện tích dễ thấm qua tế bào

mang cá, tôm, đồng thời có khả năng hòa tan chất béo (Phạm Văn Ty và Vũ Nguyên Thành, 2009). Sự hiện diện của  $\text{NH}_3$  trong ao nuôi phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó đáng kể nhất là độ mặn, nhiệt độ và pH, hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  dao động từ 0,2-2 mg/L và  $\text{NH}_3 < 0,1$  mg/L sẽ đảm bảo tốt cho sự phát triển của tôm thẻ chân trắng. Hàm lượng TAN trong các ao TN thường được duy trì  $\leq 2$  mg/L phù hợp cho tăng trưởng và phát triển của tôm thẻ chân trắng (Whetstone và ctv, 2002).

### 1.9.2. Nitrite và Nitrate

Độc tính của nitrite tác động đến hệ thống tuần hoàn và hệ thống miễn dịch của động vật. Nitrite xâm nhập vào máu và kìm hãm việc gắn oxy vào sắt của hemoglobin nên ngăn cản khả năng vận chuyển oxy. Theo Whetstone và ctv (2002) nồng độ nitrite trong ao nuôi tôm phải nhỏ hơn 0,23 mg/L được xem là an toàn và Boyd (1998) cho rằng đối với ao nuôi thủy sản nồng độ nitrite nhỏ hơn 0,3 mg/L Theo Zweig và ctv. (1999), nitrate là sản phẩm cuối cùng của quá trình nitrate hóa và nồng độ thường cao hơn cả ammonia và nitrit nhưng ít độc hơn. Nồng độ nitrate cao có thể ảnh hưởng đến quá trình thẩm thấu và vận chuyển ôxy, nhưng nồng độ độc hại cao hơn nhiều so với ammonia và nitrite (Lawson, 1995). Nồng độ nitrate cao cũng có thể dẫn đến hiện tượng phú dưỡng và phát triển quá mức của tảo và thực vật thủy sinh, có thể có tác động tiêu cực đến các loài thủy sản nuôi (Zweig và ctv., 1999).

## 1.10. Tình hình nghiên cứu ứng dụng của vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản

### 1.10.1. Tình hình ứng dụng vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản trong nước

Ở Việt Nam, việc ứng dụng vi sinh trong nuôi trồng thủy sản phát triển ngày càng nhanh với nhiều loại chế phẩm sinh học ra đời có nguồn gốc trong nước hay nước ngoài. Lại Thúy Hiền (2008) đã phân lập và sản xuất được 2 chế phẩm Nitrobact 1, 2, ứng dụng cho cơ sở nuôi tôm ở Thừa Thiên Huế, 2 chế phẩm vừa có hiệu quả xử lý ô nhiễm nước nuôi tôm và vừa có hiệu quả kinh tế. Phạm Thị Tuyết Ngân (2012) đã nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*), đã phân lập và định danh 4 chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* B8, B9, B37 và B38, 1 chủng vi khuẩn *Bacillus amyloiquefaciens* B41, 1 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B67, 2 chủng vi khuẩn *Nitrosomonas nitrosa* S8,

S12 và 2 chủng vi khuẩn *Nitrobacter winogradskyi* N10, N12. Lê Thanh Huyền và ctv (2014) đã phân lập vi khuẩn oxy hoá ammonium tại khu vực nuôi thủy sản ven biển huyện Tiên Lãng và huyện đảo Cát Hải, thành phố Hải Phòng, chọn lọc được 1 chủng vi khuẩn có hoạt tính oxy hoá ammonium cao ở nhiệt độ 25 – 30<sup>0</sup> C, pH từ 6 - 8, oxy hoà tan > 2 mg/l, tốc độ loại bỏ ammonium trong hệ thống nuôi liên tục với vật liệu dính bám là hạt nhựa nổi dao động trong khoảng từ 18,72 - 25,34 g/m<sup>3</sup> /ngày, trung bình là 20,95 g/m<sup>3</sup> /ngày. Trần Đình Vũ Nguyên và ctv (2014) đã định danh và nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp của 4 chủng *Bacillus* phân lập từ tôm hùm bông (*Panulirus ornatus*). Kết quả cho thấy cả 4 chủng đều có hoạt tính kháng khuẩn và có 3 chủng có khả năng sinh protease ngoại bào. Trong đó, *Bacillus pumilus* có khả năng kháng khuẩn mạnh nhất với chủng *Vibrio owensii* DY05 mới được chứng minh gây bệnh nguy hiểm trên tôm hùm bông. Phương Thị Hương và Vũ Văn Hạnh (2017) khảo sát tỷ pH 7, 37<sup>o</sup> C, sử dụng 7% giống, với nguồn carbon chính là glucose (1,5%), nguồn nitơ chính là peptone (1%), bổ sung 50 mM ion Ca<sup>2+</sup> thì sau 24 giờ lên men chủng vi khuẩn *B. subtilis* BSVN15 đạt được mật độ 6,33x10<sup>11</sup> CFU/ml. Phạm Thị Tuyết Ngân và ctv (2020) tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn chuyên hóa đạm tiềm năng trong bùn đáy ao nuôi tôm thẻ chân trắng là chủng vi khuẩn TB7.2 tương ứng với hiệu suất oxy hóa ammonia cao nhất 39,02% và hàm lượng NO<sub>2</sub> - sinh ra là 0,11 mg/L. Chủng TV4.2 có khả năng oxy hóa nitrite đạt hiệu suất 27,8% với hàm lượng nitrate sinh ra nhiều nhất, đạt 7,8 mg/L sau 5 ngày nghiên cứu, có tiềm năng ứng dụng xử lý nước nuôi trồng thủy sản.

Cao Ngọc Diệp và ctv (2009) đã ứng dụng thành công loài vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* loại bỏ N trong nước ao cá tra nhiễm ammonium cao và vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* còn loại bỏ N trong nước rác thải hữu cơ (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thị Hoàng Nam, 2012). Bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* và xạ khuẩn *Streptomyces paravulus* giúp thúc đẩy nhanh phân hủy vật chất hữu cơ trong môi trường nuôi tôm thẻ chân trắng (Phạm Thị Tuyết Ngân, 2016). Hoàng Phương Hà và ctv (2017) tạo chế phẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn nitrate hóa có hiệu quả chuyển hóa ammoni trên 95% trong hệ lọc ở điều kiện phòng thí nghiệm, và ứng dụng thành công tại đầm, ao nuôi trồng thủy sản của các Tỉnh Thanh Hóa và

Sóc Trăng với hàm lượng TAN luôn thấp hơn 0,1mg/L khi sử dụng chế phẩm vi khuẩn nitrate hóa. Các chế phẩm vi sinh sử dụng trong nuôi tôm bao gồm CPVS xử lý chất hữu cơ, CPVS xử lý khí độc ở đáy ao, CPVS đối kháng *Vibrio* gây bệnh, CPVS bổ sung vào thức ăn, đặc biệt hai chủng CPVS xử lý khí độc và đối kháng *Vibrio* được sử dụng nhiều hơn bởi các hộ nuôi tôm bán thâm canh và thâm canh (Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh và ctv, 2017).

### **1.10.2. Tình hình ứng dụng vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản trên thế giới**

Trên thế giới, việc ứng dụng vi sinh vật vào nuôi trồng thủy sản được thực hiện khá phổ biến, đã có rất nhiều nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới được công bố làm tiền đề cho nghiên cứu này. Tác giả Grommen và ctv (2002), cấy hỗn hợp vi khuẩn nitrate hóa (*Nitrosomonas* và *Nitrobacter*) trong một sản phẩm probiotic có tên thương mại là ABIL (ammonia binding inoculum liquid) vào bể lọc tuần hoàn trong hệ thống nước ngọt và nước lợ, kết quả cho thấy với hàm lượng ABIL 3 - 5 mg/L có thể loại bỏ TAN và  $\text{NO}_2^-$  dưới mức phát hiện trong vòng 4 - 14 ngày vận hành trong cả hai hệ thống nói trên. Meunpol và ctv (2003) sử dụng “chế phẩm vi sinh” với chủng vi khuẩn *Bacillus* S11 trộn vào thức ăn viên công nghiệp cho ấu trùng tôm sú ăn, sau khi cho ăn thức ăn trộn chế phẩm vi sinh trong một tháng thì cấy vi khuẩn *V. harveyi* rồi sục ozone vào từng bể (0,333 - 0,341 mg  $\text{O}_3/\text{mL}$ ) cho thấy tỉ lệ sống của tôm được xác định sau 6 ngày đạt cao nhất 75% ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn và tỷ lệ sống chỉ đạt 18% ở đối chứng. Một thí nghiệm khác của Grommen và ctv (2004), cho thấy loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong bể lọc tuần hoàn cả 2 hệ thống nước lợ và nước ngọt có bổ sung ABIL là *N. marina*. Điều này cho thấy vi khuẩn này có thể tồn tại cả trong 2 môi trường và tham gia vào quá trình nitrite hóa trong bể lọc. Deeseenthum và ctv (2007) nghiên cứu các chủng vi khuẩn *Bacillus* K KU02 và *Bacillus* K KU03 đã phân lập từ ruột tôm càng xanh được trộn vào thức ăn, có kết quả tương đối tốt với sự tăng trưởng chiều dài và trọng lượng ấu trùng của tôm càng xanh ở các bể có cho vi khuẩn vào cao hơn (7,48 cm) và (3,32 g) so với bể đối chứng (6,6 cm) và (2,1 g). Mujeeb và ctv (2010) đã thử nghiệm 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* NL110 và *Vibrio* NE17 được phân lập từ trứng và ấu trùng để nghiên cứu trên ấu trùng tôm càng xanh, kết quả

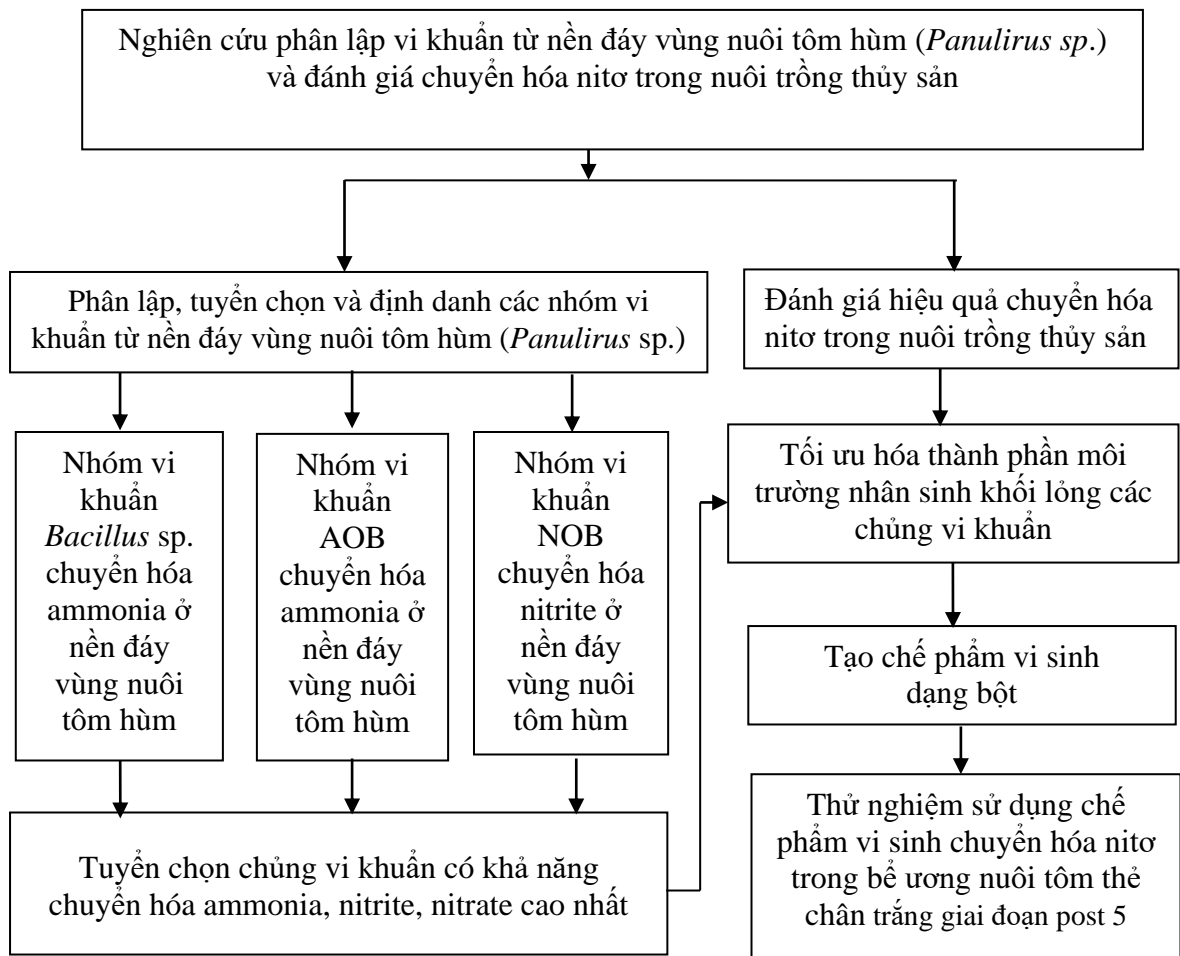
cho thấy có sự cải thiện đáng kể về trọng lượng và tốc độ tăng trưởng của ấu trùng. Tỷ lệ sống của ấu trùng cao hơn so với nghiệm thức không có sử dụng chế phẩm, chất lượng nước được cải thiện, làm giảm hàm lượng nitrate và amonia, cải thiện hệ thống miễn dịch của ấu trùng như tế bào máu và hoạt động của phenoloxidase. Nghiên cứu của Zhang và ctv (2011) cho thấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* YZN - 001 không những có khả năng chuyển hóa ammonium mà còn chuyển hóa cả nitrite với 275,08 mg/l  $\text{NO}_2^-$  sau 24 giờ, đã chuyển hóa hoàn toàn 171,4 mg/l  $\text{NO}_3^-$  sau 18 giờ. Một thí nghiệm tại Vịnh Cam Ranh vào năm 2014 của tác giả Lucy Towers, những con tôm hùm *P. ornatus* được lựa chọn, có chiều dài mai  $98,1 \pm 3,8$  mm và trọng lượng  $866,7 \pm 95,6$  g, được cho ăn hàng ngày với cá tạp (cá nhỏ và cua) trộn với chế phẩm sinh học Sanolife Bacillus với liều lượng 4 g/kg hoặc 8g/kg thức ăn trước khi cho ăn. Kết quả cho thấy, chế phẩm Sanolife Bacillus có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh đã được phân lập từ mẫu máu như *Vibrio*, *Rickettsia* hay nhóm virus TSV và WSSV. Ngoài ra, việc cung cấp men vi sinh Sanolife (8 g/kg thức ăn) dẫn đến sự khác biệt đáng kể về chu kỳ thay lông, chiều dài mai và tỷ lệ đẻ trứng. Sarmila Muthukrishnan và ctv (2015), phân lập vi khuẩn từ mẫu nước thải sau khi thu hoạch tôm cấy trên môi trường Nitrate Agar (SRL, Sisco Research Laboratoau ries Pvt. Ltd, Mumbai, India) có bổ sung 2% (w/v) NaCl, sau đó cho dịch huyền phù vi khuẩn được cho vào trong mỗi bình 25L nước thải, tiến hành đo TAN và Nitrite sau 24 giờ trong 5 ngày, đánh giá được hiệu suất chuyển TAN và nitrite của 3 chủng vi khuẩn trong thời gian 5 ngày cao nhất là 73,80% (TAN), 91,61% (nitrite). Lei Yang và ctv (2016) đã sử dụng phương pháp giải trình tự gen vùng 16S rRNA với cặp mồi 27F and 1492R định danh 3 chủng vi khuẩn khử nitrate trong mẫu bùn, kết quả 3 chủng vi khuẩn dị dưỡng khử nitơ là *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas putida* và *Pseudomonas aeruginosa*. Hastuti, (2019) đã định danh vi sinh vật chuyển hóa nitrite từ nước nuôi cua, kết quả định danh được 3 chủng vi khuẩn *Pantoea calida*, *Pseudomonas stutzerii* và *Halomonas* sp. với độ tương đồng là 99%, ứng dụng các chủng vi khuẩn vào trong chuyển hóa nitrite.

## CHƯƠNG 2

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

Sơ đồ các bước nghiên cứu thể hiện như trong Hình 2.1



**Hình 2.1.** Sơ đồ tiến trình nghiên cứu

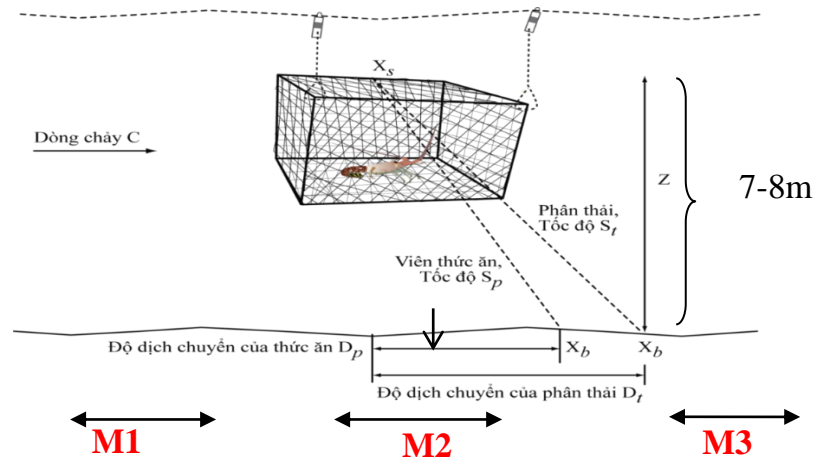
#### 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

L luận án được thực hiện từ tháng 8/2016 đến tháng 07/2017 tại Vịnh Xuân Đài, Huyện Sông Cầu, Tỉnh Phú Yên, từ tháng 08/2016 – 08/2020 tại phòng thí nghiệm Công Nghệ Vi Sinh, Viện Nghiên cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường và Trại thực nghiệm Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm Tp.HCM.

## 2.3. Phương pháp thu mẫu bùn đáy

### 2.3.1. Vị trí thu mẫu

Mẫu thu từ tháng 8/2016 – 7/2017, định kỳ mỗi tháng 1 lần (12 lần thu mẫu) tại 11 lồng treo và lồng chìm, tổng số mẫu thu về là 132 mẫu bùn. Mẫu bùn được thu bằng hệ thống ống PVC đã được tiệt trùng bằng dung dịch cồn 70%. Tại mỗi khu vực nuôi tôm, mẫu bùn được thu tại nền đáy tại 3 vị trí (M1, M2, M3) như Hình 2.2 (M1 cách M2: 1 – 2 mét, M2 cách M3: 1-2 mét) (TCVN 6663-13:2000).



(M1, M2, M3: Các điểm lấy mẫu bùn)

**Hình 2.2.** Mô tả sự thải phân và thức ăn thừa (Price và Morris, 2013)

Mẫu nước, bùn được giữ lạnh bằng nước đá và chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 12 - 24 giờ, sau đó được bảo quản ở 4°C, xử lý trong vòng 2 giờ. Các thông tin như địa chỉ lồng, thứ tự lồng, ngày tháng, thời gian thu mẫu được ghi đầy đủ trên nhãn và dán trên chai thu mẫu (TCVN 6663-3:2016, TCVN 6663-15:2004).

### 2.3.2. Phương pháp phân tích hóa lý của mẫu bùn:

Chỉ tiêu phân tích trên đo định kỳ: 1 tháng/1 lần, trong 12 tháng.

- Độ mặn: đo bằng khúc xạ kế có thang đo 100. Đo pH bằng máy đo pH
- Ammonia: Sử dụng phương pháp trắc quang 4500 NH<sub>3</sub> – F (APHA, 2012)
- Nitrite: Sử dụng phương pháp trắc quang 4500 NO<sub>2</sub> - B (APHA, 2012).
- Nitrate: Sử dụng phương pháp trắc quang 4500 NO<sub>3</sub> – D (APHA, 2012) để phân tích nitrate.
- Nitơ tổng số: sử dụng phương pháp Kjeldahl theo TCVN 6638:2000.

## **2.4. Nội dung 1: Phân lập và định danh vi khuẩn chuyển hóa Nitơ từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm.**

### **2.4.1. Phân lập và định danh vi khuẩn *Bacillus* sp. chuyển hóa ammonia**

#### **2.4.1.1. Phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp.**

##### ***Môi trường phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp.***

Phân lập trên môi trường Trypticase soya agar (TSA) (phụ lục 1.2) có bổ sung NaCl ở các nồng độ 1,5%, 2%, 2,5%, 3% và 3,5%. Vi khuẩn *Bacillus* có khả năng chịu đựng được điều kiện nhiệt độ cao và có khả năng sinh bào tử khi gặp điều kiện bất lợi, vì vậy, phân lập *Bacillus* được tiến hành bằng phương pháp xử lý ở nhiệt độ cao trên 80°C để giết chết những chủng vi khuẩn tạp khác không có khả năng tạo bào tử, giữ lại những chủng vi khuẩn có khả năng tạo bào tử (Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002, Nguyễn Đức Lượng và ctv, 2006).

##### ***Tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng xử lý ammonia.***

Sau khi phân lập được các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp., các chủng vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường ammonium-calcium-carbonate agar (phụ lục 1.2) trong 48 giờ, được đem đi kiểm tra khả năng xử lý ammonia bằng thuốc thử bằng bộ test kit NH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub> Sera, dựa vào thang màu của bộ kit Sera NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub> để tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng chuyển màu môi trường sang màu vàng hay màu xanh nhạt.

#### **2.4.1.2. Phương pháp định danh sinh hóa vi khuẩn *Bacillus* sp.**

Tiến hành nhuộm Gram, nhuộm bào tử, xác định các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa theo khóa phân loại bergey (phụ lục 1.2) như tính di động, sản sinh catalase, sự khử nitrate, thủy phân gelatin, thủy phân tinh bột, phản ứng Voges - proskauer (VP), các phản ứng lên men đường khảo sát ở các nồng độ muối khác nhau, phát triển tại các nhiệt độ khác nhau, methyl red thực hiện theo Sharmin và Rahman (2007).

#### **2.4.1.3. Phương pháp định danh sinh học phân tử vi khuẩn *Bacillus* sp.**

***Ly trích ADN:*** Mẫu vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường LB đạt mật độ 10<sup>6</sup> CFU/mL được tiến hành tách chiết ADN bằng bộ kit AccuPrep Genomic ADN extraction (theo hướng dẫn của nhà sản xuất Bioneer, Hàn Quốc) (Boon và ctv,



2002; Schuurman và ctv, 2004).

**Kiểm tra chất lượng ADN sau khi trích** (Schuurman và ctv, 2004).

**Khuếch đại vùng gen mục tiêu bằng phản ứng PCR:** Đối với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* sp. được thực hiện phản ứng PCR và định danh với cặp mồi ITS chung cho vùng 16S-RNA 27F (5' AGATTTGATCCTGGCTCAG 3') và 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Schuurman và ctv, 2004).

**Kiểm tra sản phẩm PCR:** Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,5% trong TBE buffer 0,5 X ở điện thế 100 V trong 35 phút. Sau đó nhuộm bằng Gel Red, kết quả được xem dưới đèn UV và mẫu PCR đạt yêu cầu sẽ được giải trình tự, xử lý trình tự bằng fastPCR và so sánh trình tự tại NCBI/BLAST (Schuurman và ctv, 2004).

**Giải trình tự đoạn gen đã khuếch đại:** Gửi sản phẩm PCR cho công ty Nam Khoa (địa chỉ 793/58 Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, quận 7, thành phố Hồ Chí Minh). Thực hiện giải trình tự theo phương pháp Sanger, 1977. Tiến hành so sánh trình tự thu được với ngân hàng gen để xác định tên loài vi khuẩn khảo sát.

**Xây dựng cây phả hệ:** Thu thập các trình tự tham chiếu có trên GenBank cùng với Assession Number làm cơ sở để xây dựng cây phả hệ. Sử dụng công cụ Alignment của phần mềm MEGA X đóng hàng các trình tự bằng phương pháp ClustalW, kết quả Alignment được sử dụng làm cơ sở nhằm xây dựng cây phả hệ. Tiến hành xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm MEGA X theo phương pháp Neighbor Joining với hệ số bootstrap là 1000 (Kurma và ctv, 2018)

## **2.4.2. Phân lập và định danh vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB)**

### **2.4.2.1. Môi trường phân lập vi khuẩn chuyển hóa ammonia (phụ lục 1.3.1)**

Môi trường phân lập vi khuẩn: môi trường ammonium-calcium-carbonate được sử dụng để phân lập vi khuẩn dựa theo phương pháp của Ehrlich (1975).

Môi trường nuôi tăng sinh vi khuẩn được chuẩn bị theo công thức môi trường của Lewis và Pramer (1958) và MacDonad và Spokes (1980).

Thuốc thử Griess – Ilosway (Nguyễn Đức Lượng và ctv, 2006)

### **2.4.2.2. Các bước phân lập nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia**

**Kiểm tra sự hiện diện nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia:** Mẫu bùn được

khuấy đều rồi chuyển 10g bùn hỗn hợp vào chai chứa 90mL nước cất tiệt trùng, lắc đều sau đó chuyển dung dịch huyền phù vi khuẩn vào môi trường lỏng ammonium – calcium – carbonate có bổ sung NaCl các nồng độ 1,5%, 2%, 2,5%, 3% và 3,5%, pha loãng thành nhiều nồng độ. Các ống falcol chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn này và các ống đối chứng âm (không cho dung dịch vi khuẩn vào) được ủ trong tối ở 28 °C trên máy lắc khoảng 21 ngày. Cứ sau 3 ngày kiểm tra sự hiện diện nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia trong mẫu bùn bằng thuốc thử Griess – Ilosway để cách kiểm tra sự chuyển hóa  $\text{NH}_4^+$  thành  $\text{NO}_2^-$  (Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp, 2010).

**Xác định dương tính đối với nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia:** Dung dịch thuốc thử A, B, C được trộn lẫn theo tỉ lệ 1:1:1 cho vào 5mL dịch huyền phù vi khuẩn, lắc đều rồi để yên 5 phút xem kết quả. Các ống dương tính có màu hồng đậm hay nhạt, các ống đối chứng âm không cho phản ứng màu (Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp, 2010).

**Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn AOB theo MPN:** Số lần dương tính hay âm tính của mẫu bùn được ghi nhận và tra bảng thống kê Mac Crady để suy ra giá trị ước đoán số lượng vi sinh vật trong mẫu. Đơn vị tính mật độ của vi khuẩn là MPN/g (Ehrlich, 1975).

**Nuôi tăng sinh và phân lập vi khuẩn:** Để thu được mật độ vi khuẩn cao và loại bỏ khuẩn tạp, 20 mL môi trường nuôi tăng sinh có chứa NaCl được cho vào các ống falcon. Sau đó cho 1 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn đã xác định được có sự hiện diện của nhóm AOB được chuyển vào các ống falcon chứa môi trường tăng sinh. Các ống được ủ trong bóng tối ở 28 °C trên máy lắc trong 21 ngày. Sau 7 ngày, thêm vào các ống môi trường trên dung dịch 0,53 mg  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và 0,005 mL NaOH 1M đã tiệt trùng, kiểm tra sự có mặt của  $\text{NO}_2^-$  ở các ống môi trường phân lập vi khuẩn bằng thuốc thử Griess – Ilosway. Sau 3 ngày, kiểm tra khả năng nhiễm vi khuẩn dị dưỡng trong các ống đó bằng môi trường phân lập vi khuẩn TSA (bổ sung NaCl). Nếu không có vi khuẩn dị dưỡng phát triển trên môi trường TSA, chứng tỏ đã thu được giống vi khuẩn chuyển hóa ammonia thuần. Tiến hành hút 100  $\mu\text{L}$  dịch huyền phù vi khuẩn cho vào đĩa chứa môi trường thạch ammonium – calcium –

carbonate ủ trong thời gian 2 - 4 ngày để phân lập vi khuẩn AOB (Lewis và Pramer, 1958; MacDonad và Spokes, 1980, Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp, 2010).

**Lưu trữ giống vi khuẩn:** Sau khi nhóm vi khuẩn AOB được làm thuần, giống vi khuẩn sẽ được giữ ở ống thạch nghiêng trên môi trường LB agar, hay lưu giữ ở -80°C với 15% glycerol (Montras và ctv, 2008), đồng thời bảo quản trong môi trường lỏng có chứa 0,53 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và 0,005 mL NaOH 1M (Aleem và Alexander, 1960; Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012).

#### 2.4.2.3. Phương pháp định danh sinh hóa vi khuẩn AOB

**Phương pháp nhuộm Gram và phản ứng sinh hóa:** theo Sharmin và Rahman, 2007.

**Định tính khả năng chuyển hóa ammonia của các chủng vi khuẩn AOB:** Cho 1 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn đã được phân lập vào chứa môi trường ammonium – calcium – carbonate, tiến hành ủ và lắc trong ở 28 °C với 10 ngày. Sau 10 ngày kiểm tra khả năng chuyển hóa NH<sub>4</sub><sup>+</sup> thành NO<sub>2</sub><sup>-</sup> của nhóm vi khuẩn AOB bằng thuốc thử là bộ test kit NH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub> Sera.

**Phương pháp sử dụng kit API 20E và API 20NE:** Các chủng vi khuẩn sau khi được xác định khả năng chuyển hóa ammonia thì thực hiện các phản ứng sinh hóa theo hướng dẫn của hãng Biomerieux, Pháp (The global health network, 2013). Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các kit API 20E sử dụng cho nhóm vi khuẩn gram âm có phản ứng oxidase âm tính, kit API 20NE sử dụng cho nhóm vi khuẩn gram âm có phản ứng oxidase dương tính.

#### 2.4.2.4. Phương pháp định danh sinh học phân tử vi khuẩn AOB

**Trích ADN và kiểm tra chất lượng ADN sau khi trích:** thực hiện từng bước như phương pháp của vi khuẩn *Bacillus* sp. ở mục 2.4.1.3

**Khuếch đại vùng gen mục tiêu bằng phản ứng PCR:** Đối với các chủng vi khuẩn AOB thực hiện phản ứng PCR và định danh với cặp mồi chung vùng 16S – rRNA 27F (5' AGATTTGATCCTGGCTCAG 3') và 515 R (5'-TACCGCGGC TGC TGG CAC-3') (Schuurman và ctv, 2004).

**Kiểm tra sản phẩm PCR:** thực hiện từng bước như mục 2.4.1.3.

**Giải trình tự đoạn gen đã khuếch đại:** thực hiện tương tự mục 2.4.1.3.

**Xây dựng cây di truyền:** thực hiện tương tự mục 2.4.1.3.

### **2.4.3. Phương pháp phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB)**

#### **2.4.3.1. Môi trường phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite**

Môi trường nitrite – calcium – carbonate cho phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite dựa trên phương pháp của Ehrlich, 1975.

Môi trường nuôi tăng sinh cho vi khuẩn chuyển hóa nitrite được chuẩn bị theo môi trường của Aleem và Alexande (1960).

#### **2.4.3.2. Các bước phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB)**

**Kiểm tra sự hiện diện nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite:** thực hiện các bước như mục 2.4.2.2 trên môi trường nitrite – calcium – carbonate có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau. Các ống falcol chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn này và các ống đối chứng âm (không cho dung dịch vi khuẩn vào) được ủ trong tối ở 28 °C trên máy lắc khoảng 21 ngày. Sau khi ủ, kiểm tra sự hiện diện của NO<sub>2</sub><sup>-</sup> bằng thuốc thử Griess – Ilosway (Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012).

**Xác định dương tính đối với nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite:** Thực hiện các bước như mục 2.4.2.2, phản ứng giữa dung dịch huyền phù vi khuẩn với thuốc thử Griess – Ilosway có màu trắng chứng tỏ có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB) trong môi trường, còn các ống đối chứng âm màu hồng đậm (Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012).

**Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn NOB:** tương tự của mục 2.4.2.2

**Nuôi tăng sinh và phân lập vi khuẩn:** thực hiện tương tự mục 2.4.2.2 trên môi trường nitrate - calcium – carbonate, dung dịch 20 μM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> và 0,02 mL KOH 20% đã tiệt trùng được thêm vào các ống môi trường nuôi trên theo chu kỳ 4 ngày/lần (Aleem và Alexander, 1960).

**Lưu trữ giống vi khuẩn** tương tự mục 2.4.2.2 và đồng thời bảo quản trong môi trường lỏng có các dung dịch chứa 20 μM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> và 0,02 mL KOH 20% (Aleem và Alexander, 1960; Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012).

#### **2.4.3.3. Phương pháp định danh sinh hóa vi khuẩn NOB**

**Phương pháp nhuộm Gram và phản ứng sinh hóa:** thực hiện tương tự

## 2.4.2.3

**Định tính khả năng chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn NOB:** Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường nitrite - calcium - cacbonat, thực hiện tương tự mục 2.4.2.3. Dịch khuẩn sau khi tăng sinh được đánh giá khả năng xử lý nitrite bằng bộ kit test NO<sub>2</sub> của Sera.

## 2.4.3.4. Phương pháp định danh sinh học phân tử vi khuẩn NOB

**Trích ADN và kiểm tra chất lượng ADN sau khi trích:** thực hiện như mục 2.4.2.4

**Khuếch đại vùng gen mục tiêu bằng phản ứng PCR:** sử dụng cặp mồi tương tự theo mục 2.4.2.4

**Kiểm tra sản phẩm PCR:** thực hiện tương tự như mục 2.4.2.4.

**Giải trình tự đoạn gen đã khuếch đại:** thực hiện tương tự mục 2.4.2.4.

**Xây dựng cây di truyền:** thực hiện tương tự mục 2.4.2.4.

## 2.4.4. Khảo sát quá trình chuyển hóa ammonium, nitrite, nitrate của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn sau khi tuyển chọn được tăng sinh trong môi trường LB đến khi đạt mật độ 10<sup>7</sup> CFU/mL, sau đó bổ sung vào môi trường định lượng ammonia có chứa NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 10mg/l, môi trường định lượng nitrite có chứa NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 0,53 mg/l, môi trường Nitrate Broth với hàm lượng NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 13,34 mg/l, ở nhiệt độ phòng. Mẫu được thu tại thời điểm 12 giờ đến 48 giờ (nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp.), thu mẫu theo 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 7 ngày (nhóm AOB), từ 12 giờ đến 72 giờ (khảo sát chuyển hóa NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Phatthongkleang, 2019; Sang, 2020).

Hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> trong các mẫu được xác định bằng phương pháp Phenat. Hàm lượng NO<sub>2</sub><sup>-</sup> trong các mẫu được xác định bằng phương pháp Naphthylamine. Hàm lượng NO<sub>3</sub><sup>-</sup> được xác định bằng phương pháp Salicylate (APHA, 2012) ( phụ lục 1.5). Kết quả định lượng hàm lượng được đưa về hiệu suất xử lý, từ đó tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa ammonia, nitrite, nitrate cao để tạo chế phẩm sinh học. Các kết quả định lượng 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 thời gian thứ i (mg/l).

#### **2.4.5. Khảo sát khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn**

Khảo sát khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn có đặc tính chuyển hóa ammonia, nitrite, nitrate được khảo sát bằng cách: nuôi các chủng vi khuẩn có mật độ  $1,2 \times 10^8$  CFU/mL ( $OD_{600nm} = 1$ ) trong môi trường LB cho từng nhóm vi khuẩn, có bổ sung các nồng độ muối NaCl khác nhau 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% (Phatthongkleang, 2019) ở nhiệt độ phòng trong thời gian 48 giờ. Sau khi nuôi cấy, tiến hành thu dịch vi khuẩn, đo OD bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm. Đối chứng là môi trường bổ sung muối không có vi khuẩn.

### **2.5. Nội dung 2: Tạo chế phẩm vi sinh dạng lỏng và dạng bột**

#### **2.5.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng nuôi cấy và tối ưu hóa thành phần môi trường lên men tạo chế phẩm dạng lỏng của các chủng vi khuẩn**

##### **2.5.1.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng sinh khối ba chủng vi khuẩn.**

##### ***Khảo sát ảnh hưởng của môi trường tăng sinh đến phát triển vi khuẩn***

Cấy khuẩn lạc vi khuẩn từ ống giống vào ống nghiệm chứa nước cất đã hấp khử trùng đã được hấp tiệt trùng ( $121^\circ\text{C}/15$  phút), lắc đều trong thời gian 10-20 phút, đem đo OD ở bước sóng 600 nm để dựa vào đường tương quan tuyến tính, suy ra mật độ tế bào vi khuẩn ( $\log.\text{CFU}/\text{mL}$ ). Sau đó, cho 1% lượng vi khuẩn có mật độ  $10^7$  CFU/mL này vào 3 loại môi trường tăng sinh: TSB, NB, LB (thành phần môi trường ở phần phụ lục). Sau 24 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ , đếm mật độ khuẩn lạc và tính mật độ vi khuẩn để chọn lọc môi trường tăng sinh tối ưu cho từng chủng vi khuẩn.

Chỉ tiêu theo dõi mỗi thí nghiệm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng là mật độ vi khuẩn (CFU/mL) bằng phương pháp đếm khuẩn lạc gián tiếp trên thạch đĩa và dùng hàm Log cơ số 10 trong phần mềm Microsoft Excel theo công thức  $\lg a = b$  với a là mật độ vi sinh vật (CFU/mL), b là hệ số quy đổi sang  $10.\lg$  nhằm xử lý thống kê theo phương pháp phân tích ANOVA 1 yếu tố qua phần mềm MSTATC (Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods, 2016).

***Khảo sát ảnh hưởng của mật độ giống đến sự tăng sinh khối vi khuẩn***

Sau khi chọn lọc được môi trường tăng sinh, tiếp tục căn cứ vào đường tương quan tuyến tính mật độ vi sinh vật và OD<sub>600nm</sub> để chuẩn bị các mật độ vi khuẩn 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> CFU/mL, sau đó cho tỷ lệ giống 1% có các mật độ vi khuẩn khác nhau vào môi trường tăng sinh đã khảo sát, lắc trong thời gian 24 giờ, nhiệt độ 37°C, đếm khuẩn lạc ở mỗi nghiệm thức để lựa chọn mật độ vi khuẩn đầu ra cao nhất.

***Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến sự tăng sinh khối vi khuẩn***

Thực hiện thí nghiệm với môi trường, mật độ giống đã khảo sát ở thí nghiệm trên, thay đổi khoảng thời gian tăng sinh là 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ, 72 giờ. Đếm khuẩn lạc sau mỗi mốc thời gian để lựa chọn thời gian tăng sinh tối ưu nhất.

**2.5.1.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo chế phẩm dạng lỏng**

***Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nạp giống đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn trên môi trường sản xuất lỏng.***

Vi khuẩn sau khi tăng sinh theo các điều kiện như môi trường, mật độ giống, thời gian đã khảo sát ở mục 2.5.1.1 và điều chỉnh mật độ đạt 10<sup>8</sup>CFU/mL sẽ được cấy vào bình tam giác chứa 500 mL môi trường sản xuất (phần phụ lục), với tỷ lệ nạp giống lần lượt là 1,0%, 2,5%, 3,5%, và 5,0%, lắc 150 vòng/phút ở 30°C trong thời gian 24 giờ. Tính mật độ vi khuẩn, từ đó tìm được tỷ lệ giống tốt nhất.

***Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình nhân sinh khối của vi khuẩn trên môi trường sản xuất lỏng.***

Thực hiện thí nghiệm với tỷ lệ nạp giống đã được xác định, khảo sát các mốc thời gian sau: 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ, đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình nhân sinh khối của vi khuẩn trên môi trường sản xuất, chọn được thời gian nuôi cấy cho thí nghiệm tiếp theo.

***Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình nhân sinh khối của vi khuẩn trên môi trường sản xuất lỏng.***

Thực hiện thí nghiệm với tỷ lệ nạp giống, thời gian đã được xác định, lắc môi trường sản xuất vi khuẩn với 150 vòng/phút ở các nhiệt độ 30° C, 33°C, 35°C, 37°C. Xác định mật độ vi khuẩn ở mỗi mức nhiệt độ để chọn được nhiệt độ nuôi cấy tốt nhất cho thí nghiệm tiếp theo.

***Khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình nhân sinh khối của vi khuẩn trên môi trường sản xuất lỏng.***

Với tỷ lệ nạp giống, thời gian, nhiệt độ đã xác định ở thí nghiệm trên, lắc môi trường sản xuất vi khuẩn với 150 vòng/phút ở pH 6; 6,5; 7; 7,5. Từ đó xác định mật độ vi khuẩn ở mỗi mức pH nhằm chọn được pH nuôi cấy tốt nhất cho thí nghiệm.

***Khảo sát, sàng lọc nguồn nitơ và cacbon ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn trên môi trường sản xuất lỏng.***

Môi trường sản xuất TSB lỏng dựa môi trường tăng sinh TSB có thay đổi một số thành phần khoáng và hàm lượng nitơ, cacbon. Với nguồn cacbon ban đầu trong môi trường sản xuất TSB là glucose có hàm lượng 10g/L, thay đổi các nguồn cacbon là maltodextrin và mật rỉ đường, sucrose với 10g/L.

Sau khi lựa chọn được nguồn cacbon tốt nhất tiếp tục lựa chọn nguồn nitơ. Trong môi trường sản xuất TSB, ban đầu nguồn nitơ là pepton 10 g/L, thay đổi các nguồn nitơ là cao nấm men,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{NaNO}_3$  với 10 g/L.

Vi khuẩn sau khi tăng sinh và điều chỉnh mật độ đạt  $10^8$  CFU/mL sẽ được cấy vào từng môi trường để lựa chọn nguồn cacbon và nitơ với tỷ lệ nạp giống, nhiệt độ, pH và thời gian nuôi cấy tối ưu được xác định từ các thí nghiệm trước. Đếm mật độ vi khuẩn sau đó chọn ra nguồn cacbon và nitơ ảnh hưởng chính đến quá trình nhân sinh khối của vi khuẩn.

**2.5.1.3. Tối ưu hóa các thành phần môi trường nhân sinh khối của 3 chủng vi khuẩn bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RMS).**

***Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng thiết kế Plackett – Burman của vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 và *Pseudomonas stutzeri* KL15***

Khi tiến hành khảo sát đơn yếu tố, thì hai chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 và *Pseudomonas stutzeri* KL15 có cùng sử dụng nguồn cacbon và nitơ tốt nhất là mật rỉ đường và cao nấm men. Sử dụng thiết kế Plackett-Burman để sàng lọc các thông số chính trong một số lượng lớn các yếu tố của quá trình tối ưu và cho phép đánh giá các yếu tố, mỗi yếu tố đã được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1). Các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là mật rỉ đường, cao nấm men,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  và  $\text{CaCl}_2$  được liệt kê trong Bảng 2.1.



Các muối vô cơ  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $NaCl$  và  $CaCl_2$  được sử dụng trong thí nghiệm dựa trên cơ sở từ nghiên cứu của các tác giả Peng và ctv (2014), Trần Quốc Tuấn và ctv (2014), Đoàn Thị Tuyết Lê và ctv (2020) đã chứng minh là nguồn dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình phát triển sinh khối vi sinh vật.

**Bảng 2.1.** Các biến trong ma trận Plackett – Burman của 2 chủng vi khuẩn *B.licheniformis* B85 và *P.stutzeri* KL15.

Yếu tố	Ký hiệu	Mức	
		Thấp (-1)	Cao (+1)
Mật rỉ đường (g/L)	X <sub>1</sub>	2	6
Cao nấm men(g/L)	X <sub>2</sub>	9	25
$K_2HPO_4$ (g/L)	X <sub>3</sub>	1,25	5,00
$MgSO_4$ (g/L)	X <sub>4</sub>	0,25	1,50
$CaCl_2$ (g/L)	X <sub>5</sub>	0,05	0,40
$NaCl$ (g/L)	X <sub>6</sub>	1	5

Thiết kế ma trận Plackett-Burman trình bày trong Bảng 2.2, Bảng 2.3. Các yếu tố được sàng lọc cho độ tin cậy cao ( $p < 0,05$ ) sẽ được đưa vào mô hình tối ưu hóa sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt theo phương án cấu trúc RSM – BBD (Plackett & Burman, 1946; Nguyễn Cảnh, 2004).

**Bảng 2.2.** Ma trận thiết kế Plackett – Burman của vi khuẩn *B.licheniformis* B85

Thức	Các biến					
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
1	1	-1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	1
3	-1	1	1	-1	1	1
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	1	1
6	-1	-1	-1	1	-1	1
7	-1	1	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1	-1	-1
9	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	1	-1	-1	-1	1
11	1	-1	-1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1	-1	1

**Bảng 2.3.** Ma trận thiết kế Plackett – Burman của vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

Nghiệm thứ	Các biến					
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
1	1	1	-1	-1	-1	1
2	-1	1	-1	1	1	-1
3	1	-1	1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	1	1
5	-1	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	-1	-1
7	-1	-1	1	-1	1	1
8	-1	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1
10	-1	-1	-1	1	-1	1
11	1	-1	-1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1	1	-1

Vi khuẩn sau khi tăng sinh mật độ đạt  $10^8$  CFU/mL sẽ được cấy vào từng môi trường có thành phần được bố trí theo ma trận Plackett - Burman với tỷ lệ nạp giống, nhiệt độ, pH, thời gian đã được xác định. Nhập mật độ vi khuẩn vào ma trận và xử lý bằng phần mềm Design Expert 11, chọn ra 3 yếu tố ảnh hưởng chính đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn.

*Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng thiết kế Plackett – Burman của vi khuẩn Rhodococcus rhodochrous T<sub>9</sub>.*

**Bảng 2.4.** Các biến trong ma trận Plackett - Burman của vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub>.

Yếu tố	Ký hiệu	Mức	
		Thấp (-1)	Cao (+1)
Glucose (g/L)	X <sub>1</sub>	4	8
Pepton (g/L)	X <sub>2</sub>	6	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	X <sub>3</sub>	1,25	5,00
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	X <sub>4</sub>	0,25	1,50
CaCl <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>5</sub>	0,05	0,40
NaCl (g/L)	X <sub>6</sub>	1	5

Các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là glucose, pepton, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl và CaCl<sub>2</sub> được liệt kê trong Bảng 2.4, thiết kế Plackett-Burman cho phép

đánh giá các yếu tố, mỗi yếu tố đã được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1).

**Bảng 2.5.** Ma trận thiết kế Plackett – Burman của vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub>

Nghiệm thức	Các biến					
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
1	-1	-1	-1	1	-1	1
2	1	1	-1	-1	-1	1
3	1	1	1	-1	-1	-1
4	-1	-1	1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	1	1	-1
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1
8	1	-1	1	1	-1	1
9	-1	1	1	1	-1	-1
10	-1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	1	-1	1	1
12	1	-1	-1	-1	1	-1

**Tối ưu hóa các thành phần môi trường lên men vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 và *Pseudomonas stutzeri* KL15 bằng thiết kế Box – Behnken.**

Sử dụng phương pháp thiết kế Box - Behnken để tạo mô hình kiểm tra các biến cần thiết cho quá trình nhân sinh khối vi khuẩn. Trong thí nghiệm có ba mức độ khảo sát là thấp (-1), cơ sở (0) và cao (+1). Ba yếu tố ảnh hưởng chính đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn được chọn lọc từ thiết kế ma trận Plackett-Burman sẽ được sử dụng trong ma trận Box - Behken (Bảng 2.6 và 3.7), được ký hiệu lần lượt là A (Mật rỉ đường), B (Cao nấm men), C (MgSO<sub>4</sub>), C' (NaCl) (Box và Behnken, 1960).

**Bảng 2.6.** Các yếu tố sử dụng trong Box – Behnken của *Bacillus licheniformis* B85

Yếu tố	Ký hiệu	Đơn vị	Khoảng biến thiên	Mức		
				Thấp (-1)	Cơ sở (0)	Cao (1)
Mật rỉ đường	A	g/L	2 - 6	2	4	6
Cao nấm men	B	g/L	9 - 25	9	17	25
NaCl	C'	g/L	1 - 5	1	3	5

**Bảng 2.7.** Ma trận thí nghiệm Box – Behnken của *Bacillus licheniformis* B85

Nghiệm thức	A	B	C'
1	1	1	0
2	0	1	-1
3	1	0	1
4	0	-1	1
5	1	-1	0
6	-1	0	-1
7	0	0	0
8	0	-1	-1
9	0	0	0
10	0	1	1
11	-1	-1	0
12	0	0	0
13	-1	0	-1
14	1	0	-1
15	-1	1	0

**Bảng 2.8.** Các yếu tố sử dụng trong Box – Behnken của *Pseudomonas stutzeri* KL15

Yếu tố	Ký	Đơn vị	Khoảng	Mức		
	hiệu		biến thiên	Thấp (-1)	Cơ sở (0)	Cao (1)
Mật rỉ đường	A	g/L	2 - 6	2	4	6
Cao nấm men	B	g/L	9 - 25	9	17	25
MgSO <sub>4</sub>	C	g/L	0,5 – 1,5	0,5	1,0	1,5

Sau khi xác định mật độ vi khuẩn theo ma trận thí nghiệm Box – Behnken của 2 chủng vi khuẩn, nhập mật độ vi khuẩn vào ma trận trong phần mềm Design Expert 11, đọc kết quả ở mục Analysis gồm ANOVA, Diagnostics, Model Graphs và mục Optimization để xác định phương trình hồi quy.

**Bảng 2.9** Ma trận thí nghiệm Box – Behnken của *Pseudomonas stutzeri* KL15

Nghiệm thức	A	B	C
1	1	0	-1
2	0	0	0
3	1	1	0
4	0	-1	1
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	0	-1	-1
8	0	0	0
9	0	1	-1

10	0	0	0
11	0	1	1
12	1	0	1
13	-1	1	0
14	1	-1	0
15	-1	-1	0

Hàm đáp ứng được chọn là mật độ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 ( $Y_1$ , CFU/mL), *Pseudomonas stutzeri* KL15 ( $Y_2$ , CFU/mL). Từ đó xác định mật độ vi khuẩn đạt cao nhất ở các thông số tối ưu.

Phương trình hồi quy của môi trường lên men *Bacillus licheniformis* B85 có dạng:

$$Y_1 = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C' + b_{12}AB + b_{13}AC' + b_{23}BC' + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C'^2$$

Phương trình hồi quy của môi trường lên men *Pseudomonas stutzeri* KL15 có dạng:

$$Y_2 = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2$$

Trong đó:  $b_0$  là hệ số hồi quy tại tâm;  $b_1, b_2, b_3$  là hệ số tuyến tính

$b_{12}, b_{13}, b_{23}$  là hệ số tương tác;  $b_{11}, b_{22}, b_{33}$  là hệ số bình phương

A, B và C, C' là các biến độc lập.

### ***Tối ưu hóa các thành phần môi trường lên men vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> bằng thiết kế Box – Behnken***

Sử dụng phương pháp thiết kế Box - Behnken để tạo mô hình kiểm tra các biến cần thiết cho quá trình nhân sinh khối vi khuẩn. Trong thí nghiệm có ba mức độ khảo sát là thấp (-1), cơ sở (0) và cao (+1). Ba yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn được chọn lọc ở ma trận Plackett-Burman sẽ được sử dụng trong ma trận Box – Behken (Bảng 2.10 và 3.11), được ký hiệu là A' (Glucose), B' (Cao nấm men), C' (NaCl) (Box và Behnken, 1960).

**Bảng 2.10.** Các yếu tố sử dụng trong Box – Behnken của *R.rhodochrous* T<sub>9</sub>.

Yếu tố	Ký hiệu	Đơn vị	Khoảng		Mức	
			biến thiên	Thấp (-1)	Cơ sở (0)	Cao (1)
Glucose	A'	g/L	4 - 8	4	6	8
Pepton	B'	g/L	6 - 10	6	8	10
NaCl	C'	g/L	1 - 5	1	3	5

Nhập mật độ vi khuẩn vào ma trận Box – Behken ở Bảng 2.11 được tạo từ phần mềm Design Expert 11, đọc kết quả ở mục Analysis gồm ANOVA, Diagnostics, Model Graphs và mục Optimization để xác định phương trình hồi quy.

**Bảng 2.11.** Ma trận thí nghiệm Box – Behken của *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>

Nghiệm thức	A'	B'	C'
1	0	0	0
2	1	0	1
3	1	1	0
4	0	-1	1
5	0	-1	-1
6	-1	-1	0
7	-1	1	0
8	0	1	-1
9	-1	0	-1
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	1	1
13	1	0	-1
14	-1	0	1
15	1	-1	0

Hàm đáp ứng được chọn là mật độ vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> (Y<sub>3</sub>, CFU/mL). Từ đó xác định mật độ vi khuẩn đạt cao nhất ở các thông số tối ưu.

Phương trình hồi quy có dạng:  $Y_3 = b_0 + b_1A' + b_2B' + b_3C' + b_{12}A'B' + b_{13}A'C' + b_{23}B'C' + b_{11}A'^2 + b_{22}B'^2 + b_{33}C'^2$

Trong đó:  $b_0$  là hệ số hồi quy tại tâm;  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$  là hệ số tương tác

$b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$  là hệ số tương tác;  $b_{11}$ ,  $b_{22}$ ,  $b_{33}$  là hệ số bình phương

A', B', C' là các biến độc lập.

## 2.5.2. Chế tạo chế phẩm vi sinh dạng bột

### 2.5.2.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện sản xuất của các chủng vi khuẩn trên môi trường bán rắn

#### *Khảo sát môi trường ảnh hưởng đến sinh khối các chủng vi khuẩn*

Các chủng vi khuẩn sau khi được tối ưu hóa trên môi trường TSB sản xuất sẽ được nhân lên theo đề xuất của mô hình. Sau đó tiến hành chuyển dịch vi khuẩn lỏng vào môi trường bán rắn có chứa cám gạo, cám bắp, cám lúa mì, bã đậu nành và

các chất khoáng (phụ lục 2.4) đã tiệt trùng với tỷ lệ nạp giống 5% (có mật độ  $10^8$  CFU/mL) vào các môi trường với độ ẩm 50%, nhiệt độ phòng. Sau 48 giờ nuôi cấy, đếm mật độ vi khuẩn, lựa chọn môi trường tốt nhất cho từng chủng vi khuẩn.

#### ***Khảo sát tỷ lệ nạp giống ảnh hưởng đến mật độ các chủng vi khuẩn***

Sau khi đã chọn được thành phần môi trường bán rắn phù hợp cho từng chủng vi khuẩn, khảo sát tỷ lệ nạp giống vi khuẩn là 2,5%, 5%, 7,5% và 10% (mật độ vi khuẩn  $10^8$  CFU/mL), ủ ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$  trong 48 giờ để chọn ra tỷ lệ nạp giống tốt nhất.

#### ***Khảo sát độ ẩm ảnh hưởng đến mật độ các chủng vi khuẩn***

Sau khi chọn được môi trường bán rắn, tỷ lệ nạp giống phù hợp cho từng chủng vi khuẩn, tiến hành khảo sát độ ẩm nuôi cấy các chủng vi khuẩn là 45%, 50%, 55%, 60%, ủ ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$  sau 48 giờ, đếm mật số vi khuẩn để chọn độ ẩm tốt nhất.

#### ***Khảo sát thời gian ảnh hưởng đến mật độ các chủng vi khuẩn***

Sau khi chọn được môi trường bán rắn và tỷ lệ nạp giống, độ ẩm phù hợp thì thực hiện thí nghiệm để khảo sát thời gian nuôi cấy với mốc thời gian 36, 48, 60, 72, 84, 96 giờ, ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ . Đếm mật độ vi khuẩn để chọn thời gian tối ưu.

#### **2.5.2.2. Bảo quản chế phẩm vi sinh dạng bột**

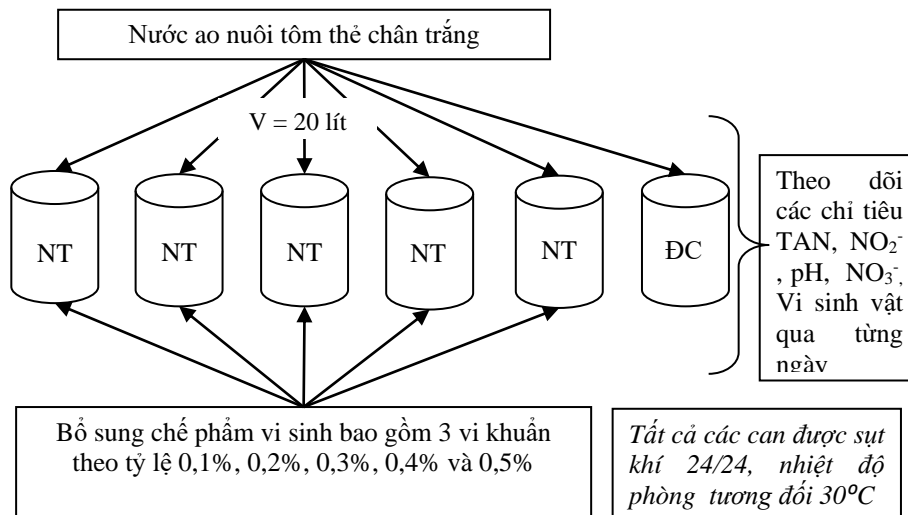
Chế phẩm vi sinh được khảo sát ở 2 mức nhiệt độ: nhiệt độ phòng ( $28 - 32^\circ\text{C}$ ), nhiệt độ tủ mát ( $4 - 8^\circ\text{C}$ ) trong thời gian bảo quản là 30, 60, 90, 120, 180, 270, 360 ngày, sau mỗi mức thời gian tiến hành đếm mật độ vi khuẩn.

### **2.6. Nội dung 3: Đánh giá chuyển hóa nitơ của các chủng vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản.**

#### **2.6.1. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở qui mô phòng thí nghiệm**

Mẫu nước (độ mặn lúc thu nước là  $21\text{‰}$ ) của ao nuôi tôm thẻ chân trắng được 1,5 tháng (không có tôm thí nghiệm) được vận chuyển về PTN vào buổi chiều tối và được thực hiện ngay vào buổi sáng hôm sau. Bổ sung các tỷ lệ chế phẩm vi sinh vật có tổng mật độ vi khuẩn  $10^8$  CFU/gam (Supono và ctv, 2019; Jefri và ctv, 2020) vào các can 20L(chứa 20L nước), theo dõi các chỉ tiêu pH, ammonia, nitrite, nitrate,

tổng vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn chuyển hóa ammonia, vi khuẩn chuyển hóa nitrite theo từng ngày, trong thời gian 5 - 6 ngày nhằm đánh giá hiệu quả chuyển hóa Nitơ của các chế phẩm vi sinh và khảo sát được tỷ lệ bổ sung vi khuẩn vào nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng. Thí nghiệm có sự khác biệt ở tất cả các bình, mỗi bình chứa 20 lít nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng có dư lượng ammonia, nitrite với các nghiệm thức như sau:



**Hình 2.3.** Sơ đồ bố trí thí nghiệm

ĐC: không bổ sung dịch khuẩn.

NT1: bổ sung 20 gam chế phẩm vi sinh đã phối trộn ở mật độ  $10^8$  (CFU/g).

NT2: bổ sung 40 gam chế phẩm vi sinh đã phối trộn ở mật độ  $10^8$  (CFU/g).

NT3: bổ sung 60 gam chế phẩm vi sinh đã phối trộn ở mật độ  $10^8$  (CFU/g).

NT4: bổ sung 80 gam chế phẩm vi sinh đã phối trộn ở mật độ  $10^8$  (CFU/g).

NT5: bổ sung 100 gam chế phẩm vi sinh đã phối trộn ở mật độ  $10^8$  (CFU/g).

### 2.6.2. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong nuôi tôm thẻ chân trắng giai đoạn ương giống ở qui mô bể xi-măng 1m<sup>3</sup>

#### Chuẩn bị tôm thí nghiệm

Tôm được mua từ công ty TNHH sản xuất giống Thủy Sản Châu Mỹ, Khánh Hội, xã Tri Hải, Ninh Hải, Tỉnh Ninh Thuận và đã được kiểm tra các bệnh do vi rút đốm trắng (WSSV), đầu vàng (YHV), bệnh gan tụy (HPV), hội chứng Taura (TSV) bằng phương pháp RT-PCR. Nước nuôi được tiến hành kiểm tra độ mặn trong các bể dưỡng nhằm đảm bảo độ mặn thích hợp với độ mặn thuần tôm giống trước khi



xuất ở trại sản xuất giống. Độ kiềm và pH cũng được kiểm tra ở khoảng tối ưu cho sự phát triển của tôm. Cấp nước biển vào khoảng  $\frac{3}{4}$  bể, xử lý với Chlorine nồng độ diệt khuẩn 30 ppm sục khí liên tục từ 2 – 3 ngày. Sau khi tôm giống nhập về được thuần trong 3 bể có thể tích  $2\text{m}^3/\text{bể}$  với thời gian 3 ngày, sử dụng thức ăn của công ty Châu Mỹ với lượng ăn  $5\text{g}/\text{bể}/\text{ngày}$ , một ngày cho ăn 5 lần. Tôm giống được nhập từ công ty Châu Mỹ ở giai đoạn post larva 5 được thuần trong 5 ngày. Khi đã thuần xong cho vào hệ thống thí nghiệm với mật độ thả  $2000\text{ con}/\text{m}^2/\text{bể}$ , cho ăn thức ăn của công ty Uni-President có hàm lượng protein thô tối thiểu là 40%, lượng ăn trung bình là  $10\text{g}/\text{bể}/\text{ngày}$ , một ngày cho ăn 5 lần. Trước khi bố trí thí nghiệm kiểm tra các yếu tố nhiệt độ, độ mặn, DO, pH,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ , phải đảm bảo rằng tôm không bị sốc khi đưa vào môi trường nước mới. Ngoài ra, kiểm tra mẫu nước có bị nhiễm *Vibrio* hay không, để tránh sai lệch kết quả thu mẫu sau này. Tiến hành thả tôm vào lúc trời mát, hạn chế tối đa những tác động cơ học ảnh hưởng đến tôm. Theo dõi tôm sau khi bố trí có bị chết hay không, nếu chết sau ngày đầu tiên thì tiến hành bổ sung thêm.

### ***Bố trí thí nghiệm***

Hệ thống thí nghiệm được thiết kế gồm 12 bể xi măng kích thước  $1 \times 1 \times 1\text{ m}$  xếp thành hai dãy. Hệ thống Aero Tube được lắp song song với hệ thống khí nhằm đảm bảo DO luôn ổn định trong suốt quá trình bố trí thí nghiệm. Với hệ thống Aero Tube nước trong bể nuôi luôn được khuấy đảo giúp hạn chế khả năng đóng đáy, tích tụ chất bẩn ở các góc chết. Thí nghiệm thực hiện trong 30 ngày và không tiến hành thay nước trong suốt quá trình nuôi, chỉ bổ sung thêm nước do quá trình bay hơi. Các thông số chất lượng môi trường như pH, nhiệt độ, độ mặn, độ kiềm được xác định trước khi thả tôm để đảm bảo tôm không bị sốc khi đưa vào môi trường nước mới. Các nghiệm thức đảm bảo sục khí liên tục để duy trì hàm lượng oxy hòa tan  $> 4\text{ ppm}$ , pH từ 7,5 – 8,5. Từ thí nghiệm 3.6.1, chọn ra được ba tỷ lệ vi sinh thích hợp với mật độ  $10^8\text{ CFU}/\text{gam}$ . Chế phẩm vi sinh được bổ sung 6 ngày/ 1 lần/ 30 ngày (chế phẩm vi sinh được bổ sung từ ngày bắt đầu thả tôm).

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với tất cả 4 nghiệm thức và 3 lần lặp lại, bao gồm:

Nghiệm thức đối chứng (NTĐC): không bổ sung chế phẩm vi sinh

Nghiệm thức 1 (NT1): bổ sung chế phẩm vi sinh với tỷ lệ 0,3%

Nghiệm thức 2 (NT2): bổ sung chế phẩm vi sinh với tỷ lệ 0,4%

Nghiệm thức 3 (NT3): bổ sung chế phẩm vi sinh với tỷ lệ 0,5%

### 2.6.3. Chỉ tiêu đánh giá

**Bảng 2.12.** Các phương pháp đánh giá chỉ tiêu chất lượng môi trường nước và vi sinh vật sử dụng trong thí nghiệm.

Chỉ tiêu	Phương pháp/dụng cụ	Số lần đo
pH	Phương pháp điện thế (máy Hanna Hi)	1 ngày/ lần
Nhiệt độ	Phương pháp điện thế (máy Hanna Hi)	1 ngày/ lần
DO	Phương pháp điện cực oxy hòa tan (máy Hanna)	1 ngày/ 2 lần
Độ mặn	Khúc xạ kế ATAGO	1 lần/ngày
Độ kiềm	Bộ test kiềm Sera và đo bằng phương pháp định phân thể tích	2 ngày/lần
Nitrate	Phương pháp khử Salicylate	2 ngày/lần
Nitrite	Phương pháp Naphthylamine	2 ngày/lần
Ammonia	Phương pháp Phenate	2 ngày/lần
Tổng VKHK	Môi trường PCA	3 ngày/lần
Tổng <i>Vibrio</i>	Môi Trường TCBS	3 ngày/lần
Vi khuẩn AOB	Môi Trường Winogradsky 1	3 ngày/ lần
Vi khuẩn NOB	Môi Trường Winogradsky 1	3 ngày/ lần

Các chỉ tiêu vi sinh được thực hiện theo phương pháp đếm số khuẩn lạc gián tiếp và được tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU/mL) (TCVN 4884-2:2015).

### 2.7. Xử lý thống kê

Sử dụng phần mềm Excel để tính các giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Tối ưu hóa bằng phần mềm Design Expert 11. Các số liệu mật độ vi khuẩn được chuyển về dạng log.CFU/g hay log.CFU/mL trước khi phân tích thống kê. So sánh thống kê giữa các nghiệm thức bằng phương pháp phân tích ANOVA trong phần mềm MSTATC.

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Nội dung 1: Phân lập và định danh vi khuẩn chuyển hóa Nitơ từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm.

##### 3.1.1. Các chỉ tiêu môi trường trong mẫu bùn được thu ở Vùng Vịnh Xuân Đài

Các chỉ tiêu về pH, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub>, độ mặn, N tổng được kiểm tra định kỳ thu mẫu tại khu vực nuôi tôm hùm, Vịnh Xuân Đài, Tỉnh Phú Yên. Thời gian theo dõi các chỉ tiêu môi trường trong 12 tháng, từ tháng 8/2016 – 7/2017

**Bảng 3.1** Các chỉ tiêu môi trường, mật độ vi sinh của mẫu bùn trong 12 tháng.

Các chỉ tiêu	Hàm lượng trung bình của các chỉ tiêu môi trường	Mật độ vi khuẩn trung bình	Khoảng biến thiên của các chỉ tiêu môi trường	Khoảng biến thiên của mật độ vi khuẩn
pH	7,3 ± 0,08		6,8 - 7,8	
Độ mặn	33 ± 2		32 - 35	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/kg)	0,425 ± 0,02		0,327 - 0,489	
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	0,07 ± 0,05		0,042 - 0,092	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	1,58 ± 0,2		1,36 - 1,92	
Nitơ tổng (mg/kg)	615 ± 19		529 - 693	1,1 x 10 <sup>4</sup> - 8,5 x 10 <sup>5</sup>
Tổng VKHK (CFU/g)		9,3 x 10 <sup>4</sup> ± 0,21		1,1 x 10 <sup>3</sup> - 7,5 x 10 <sup>4</sup>
Vi khuẩn AOB (MPN/g)		8,1 x 10 <sup>3</sup> ± 0,16		1 x 10 <sup>2</sup> - 1,4 x 10 <sup>5</sup>
Vi khuẩn NOB (MPN/g)		3,5 x 10 <sup>3</sup> ± 0,13		1,1 x 10 <sup>4</sup> - 8,5 x 10 <sup>5</sup>

Theo kết quả của Bảng 3.1 và phụ lục 1.1, cho thấy hàm lượng trung bình, khoảng biến thiên các chỉ tiêu môi trường trong 12 tháng thu mẫu, phù hợp với sự phát triển của các nhóm vi sinh AOB, NOB. Hàm lượng nitơ tổng cao từ tháng 6- tháng 12 và kết quả mật độ của tổng vi sinh vật hiếu khí cũng phát triển cao từ tháng 7- tháng 12, do đó cho thấy rằng, khi hàm lượng nitơ cao thì sẽ là nguồn dinh dưỡng cho các nhóm vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ phát triển và chuyển nitơ thành các chất đơn giản mà vi sinh vật có thể sử dụng được (Lương Đức Phẩm, 1998), trong đó có NH<sub>3</sub> hay NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Vì thế, kết quả cho thấy hàm lượng ammonia cao từ tháng 7 – 12 và phù hợp cho nhóm vi khuẩn AOB phát triển cao trong thời gian đó. Sau khi vi sinh vật chuyển hóa chất hữu cơ thành ammonia, thì nhóm vi khuẩn khác trong chu trình N lại tiếp tục chuyển hóa ammonia thành nitrite, vì vậy hàm

lượng nitrite cao từ tháng 6 – tháng 9 và mật số vi khuẩn NOB cao trong tháng 8 và tháng 9. Nghiên cứu của Strous và ctv (1999), pH phù hợp cho sự phát triển của vi khuẩn tham gia vào quá trình nitrite hóa là 6,7-8,3, hàm lượng ammonia 1g/L và nitrite 0,1g/L sẽ ức chế hoàn toàn sự phát triển vi khuẩn tham gia vào quá trình nitrate hóa. Dapena-Mora và ctv,(2007) kết luận rằng hoạt động của hệ vi khuẩn tham gia quá trình nitrate hóa giảm 50% ở nồng độ ammonia 770mg/l và nitrite 350 mg/L. Một nghiên cứu của tác giả Xie (2017) đã chỉ ra rằng nhóm vi khuẩn nitrate hóa có thể sống ở nồng độ NaCl từ 20g/l đến 75g/l.

Tóm lại, hàm lượng các chỉ tiêu môi trường đều nằm trong giới hạn cho phép các vi sinh vật AOB, NOB phát triển và tham gia vào quá trình chuyển hóa ammonia, nitrite trong bùn vùng nuôi tôm hùm. Ngoài ra, sự hiện diện của nhóm vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn AOB, NOB cũng làm tiền đề cho việc phân lập định danh nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia, nitrite trong bùn.

### **3.1.2. Nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp. chuyển hóa ammonia**

#### **3.1.2.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Bacillus* chuyển hóa ammonia**

Mẫu bùn tổng là 132 mẫu được thu thập tại khu vực nuôi tôm hùm của người dân ở Vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên được tiến hành phân lập, sau 18-24 giờ nuôi cấy đã phân lập được 93 kiểu khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, có khuẩn lạc đặc trưng như dạng tròn, bề mặt khuẩn lạc khô, nhẵn hoặc hơi nhẵn, rìa răng cưa không đều, tâm sẫm màu, màu trắng xám đến vàng nhạt và catalase dương tính (Collins and Lyne's, 1986). Các chủng vi khuẩn này được ký hiệu từ B1 – B93 và được lưu trữ trong thạch nghiêng ở 4°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Khuẩn lạc sau 18-24h, tiến hành nhuộm Gram và bào tử của 93 chủng vi khuẩn, chọn được 36 chủng vi khuẩn thuộc gram dương, tế bào hình que ngắn, nhỏ, đứng riêng lẻ, có khi xếp thành chuỗi ngắn, sinh bào tử (phụ lục 1.2.2).

#### **3.1.2.2 Chọn lọc khả năng xử lý ammonia của các vi khuẩn phân lập được.**

Tiến hành nuôi cấy 36 chủng vi khuẩn trong môi trường định lượng ammonia. Dịch vi khuẩn sau nuôi cấy được đem đi kiểm tra khả năng xử lý ammonia bằng thuốc thử bằng bộ kit Sera, kết quả cho thấy dịch khuẩn các chủng vi khuẩn chuyển sang màu vàng và màu xanh nhạt so với đối chứng vẫn có màu

xanh dương (theo thang màu của bộ kit Sera). Trong 36 chủng vi khuẩn nghi ngờ là *Bacillus* sp., xác định được 13 chủng vi khuẩn (B2, B5, B7, B9, B11, B12, B18, B31, B58, B68, B74, B85, B91) có khả năng xử lý ammonia, tiến hành định danh sinh hóa của 13 chủng vi khuẩn (phụ lục 1.2.2)

### 3.1.2.3. Kết quả định danh sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Bảng 3.2 (phụ lục 1.2.2) cho thấy các chủng vi khuẩn có kết quả các phản ứng sinh hóa đặc trưng khá phù hợp với khóa phân loại Bergey, sống trong môi trường chứa NaCl 6,5%, có khả năng thủy phân tinh bột, protein và gelatin bởi chúng bài tiết ra các enzyme ngoại bào để thủy phân các đại phân tử như protein, tinh bột thành các amino acid và các monosaccharide sau đó vận chuyển vào tế bào cho quá trình trao đổi chất ( Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002).

**Bảng 3.2.** Kết quả các phản ứng sinh hóa của 13 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Phản ứng sinh hóa	Các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.												
	B2	B5	B7	B9	B11	B12	B18	B31	B58	B68	B74	B85	B91
Hoạt tính catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinh indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sử dụng citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Khử nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tan chảy gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Di động	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phân giải tinh bột	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phân giải casein	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 5% 6,5%, 7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Dựa vào khóa phân loại Bergey (phụ lục 1.2.2), có thể nghi ngờ 13 chủng vi khuẩn này thuộc chi *Bacillus*, tuy nhiên kết quả sinh hóa vẫn chưa xác định được chính xác chi và loài vi khuẩn, do đó cần thực hiện thêm phương pháp giải trình gen vùng 16S-rRNA để định danh vi khuẩn.

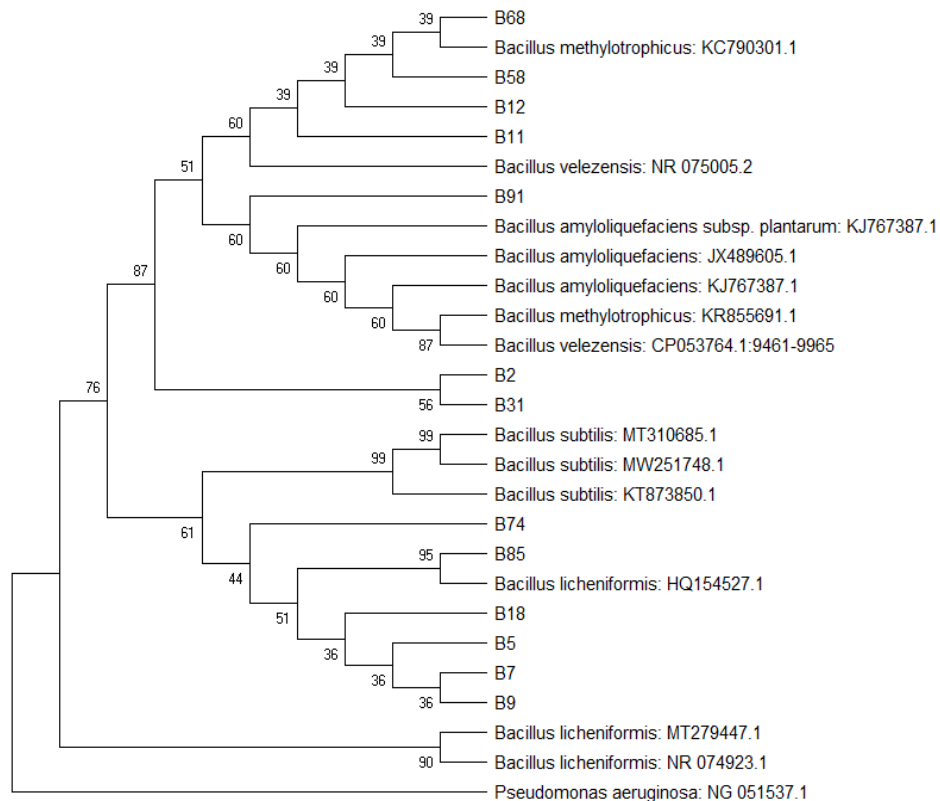
### 3.1.2.4. Kết quả định danh sinh học phân tử các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Tiếp tục định danh 13 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. (B2, B5, B7, B9, B11, B12,

B18, B31, B58, B68, B74, B85, B91) đến loài bằng phương pháp giải trình tự vùng 16S -rRNA.

**Bảng 3.3** Kết quả định danh vùng 16S – rRNA của 13 chủng *Bacillus* sp.

STT	Chủng vi khuẩn	Tên khoa học	Độ tương đồng	Trình tự tham chiếu	Accession number
1	B2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	KJ767387.1	OL693024
2	B5	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	MN256105.1	OL693021
3	B7	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	MT588731.1	OL693029
4	B9	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	GU227615.1	OL693030
5	B11	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	OK040143.1	OL693031
6	B12	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	MN252546.1	OL693032
7	B18	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	MF521959.1	OL693033
8	B31	<i>Bacillus velezensis</i>	99%	CP053764.1	OL693025
9	B58	<i>Bacillus velezensis</i>	99%	KC172050.1	OL693022
10	B68	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	99%	KC790301.1	OL693023
11	B74	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	MW251748.1	OL693026
12	B85	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%	HQ154527.1	OL693027
13	B91	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	99%	KR855691.1	OL693028



**Hình 3.1.** Cây phả hệ của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Bảng 3.3 cho thấy các đoạn trình tự vùng 16S của các chủng *Bacillus* sp. khi đem đối chiếu với ngân hàng dữ liệu gen đều có mức tương đồng với các trình tự

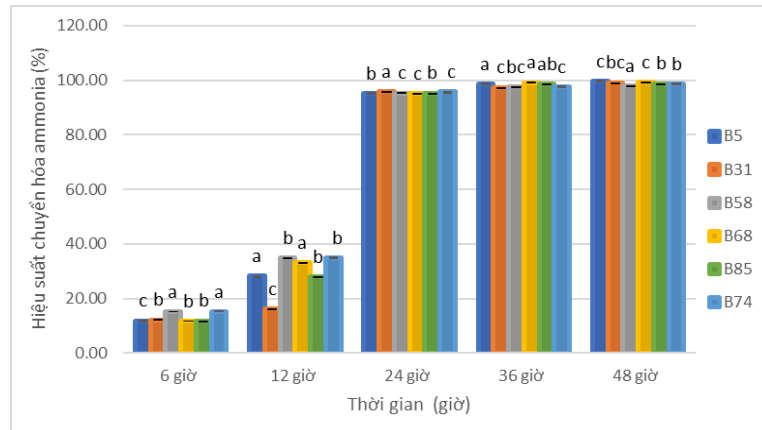
tham chiếu từ 99%- 100%. Hình 3.1 cho thấy cây phả hệ được xây dựng dựa trên các vùng trình tự 16S – rRNA của 13 chủng vi khuẩn phân lập đều được xác định thuộc chi *Bacillus* sp. và không phát sinh loài mới, chứng tỏ 13 chủng vi khuẩn phân lập được đều thuộc chi *Bacillus* sp. Ở nhóm phân nhánh đầu tiên, chủng vi khuẩn B2, B11, B12, B31, B58, B68, B91 có liên quan đến các chủng vi khuẩn *Bacillus methylophilus*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloquelificans*. Nhóm phân nhánh thứ hai, chủng vi khuẩn B5, B7, B9, B18, B74 liên quan đến chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Tuy nhiên, trên cả hai phân nhánh, hệ số bootstrap của trình tự nhóm vi khuẩn phân lập so với trình tự các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* tham chiếu trên GenBank khá thấp, chưa đủ để phân biệt rõ ràng giữa các loài *Bacillus*, nên chỉ kết luận các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* sp. Ở một nhánh phân nhóm nhỏ hơn trong nhánh hai, cho thấy hệ số bootstrap của chủng vi khuẩn B85 với trình tự tham chiếu là *Bacillus licheniformis* là 95%. Do đó, chỉ có thể xác định chủng B85 là vi khuẩn *Bacillus licheniformis*, các chủng vi khuẩn còn lại (B2, B5, B7, B9, B11, B12, B18, B31, B58, B68, B74, B91) là vi khuẩn *Bacillus* sp. Các trình tự gen của 13 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. được đưa vào Genbank như là nguồn dữ liệu cho nghiên cứu so sánh.

### **3.1.2.5. Kết quả đánh giá khả năng chuyển hóa ammonia của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. đã phân lập**

Tiến hành nuôi 13 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. đã được định danh (B2, B5, B7, B9, B11, B12, B18, B31, B58, B68, B74, B85, B91) trong môi trường định lượng có chứa  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Các chủng vi khuẩn đều có khả năng chuyển hóa ammonia trong đó có 7 chủng chuyển hóa ammonia với hiệu suất từ 81- 92% (B2, B7, B9, B11, B12, B18, B91) thể hiện ở phụ lục 1.2.4 - bảng 1.1 và 6 chủng vi khuẩn chuyển hóa trên 97% (B5, B31, B58, B68, B74 và B85) ở hình 3.2 (phụ lục 1.2.4 - bảng 1.2).

Sau 6 giờ cấy vi khuẩn vào môi trường định lượng ammonia B58 và B74 thích ứng với môi trường nhanh hơn so với 4 chủng vi khuẩn còn lại, vi khuẩn B5 có khả năng thích nghi chậm nhất với hiệu suất chuyển hóa ammonia là 11,8% so với B58 và B74. Đến thời điểm 12 giờ B5, B68 đã bắt đầu phát triển

manh mẽ trong môi trường mới, sinh khối tăng nhanh nên khả năng xử lý ammonia cao nhất so với các chủng còn lại đặc biệt B5 có khả năng xử lý ammonia gấp 13,5 lần so với thời điểm 6 giờ, bên cạnh đó B31 chuyển hóa ammonia chậm nhất.



**Hình 3.2.** Hiệu suất chuyển hóa ammonia của 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Đến 24 giờ, hiệu suất chuyển hóa ammonia của tất cả các chủng đều tăng vượt bậc so với thời điểm trước đó, điều này có thể giải thích vì tại thời điểm 24 giờ vi khuẩn phát triển mạnh nhất, quá trình phân chia tế bào mạnh mẽ và đạt được mật độ vi khuẩn cao nhất nên hiệu quả xử lý ammonia đạt mức cao (>85%), nổi bật là chủng vi khuẩn B31 với hàm lượng ammonia bị xử lý cao nhất gấp 9,8 lần so với 12 giờ. Sau 24 giờ (36 – 48 giờ) do môi trường ngày càng cạn kiệt dinh dưỡng (vì môi trường không được cung cấp liên tục) và sự biến đổi pH dẫn đến sự suy giảm mật độ tế bào cũng như khả năng xử lý ammonia của các vi khuẩn chậm lại (đạt khoảng 3,7 – 5,5 % so với thời điểm 24 giờ), hàm lượng ammonia chuyển hóa không đáng kể từ 0,3 - 0,5 mg/L. Đến thời điểm 48 giờ cho thấy tất cả 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* đều có khả năng xử lý ammonia, với 3 chủng vi khuẩn B5, B31, B68 có hàm lượng ammonia bị chuyển hóa cao nhất (> 99 %), tiếp theo là B74, B85 có hiệu suất chuyển hóa ammonia >98%, thấp nhất là B58 với hiệu suất đạt 97,9 %. Theo kết quả nghiên cứu của Yang và ctv (2011) đã phân lập được vi khuẩn *Bacillus subtilis* A1 có khả năng xử lý ammonia đạt 58,4% trong 60 giờ trên môi trường có muối acetate làm nguồn carbon chính (tỉ lệ C:N là 6:1). Phạm Thị Tuyết Ngân (2012) đã phân lập trong ao tôm sú, chủng vi khuẩn *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* trong bùn nuôi tôm sú có khả năng chuyển hóa



đạm. Ngoài ra, nghiên cứu của Xie và ctv (2013) đã khảo sát khả năng phân giải ammonia của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* HN, nghiên cứu được tiến hành ở hàm lượng N-NH<sub>4</sub> 4mg/L trong thời gian khảo sát 72 giờ và kết luận chủng *Bacillus amyloliquefaciens* HN có khả năng phân giải ammonia, hiệu suất đạt được tại thời điểm 48 giờ trên 79,8%. Phatthongkleang (2019) phân lập 5 chủng vi khuẩn *Bacillus* trong bùn, nước thải nuôi tôm và nước thải sinh hoạt có khả năng chuyển hóa ammonia từ 84,21% - 94,86%. Sang (2020), khảo sát khả năng phân giải ammonia của vi khuẩn *Bacillus* sp. SC16 trong 48 giờ là 36,6% với hàm lượng N-NH<sub>4</sub> ban đầu là 165,49 mg/L. Tác giả Xue Li và ctv (2021) đã khảo sát hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus megaterium* và *Bacillus subtilis* xử lý ammonia trong hệ thống nuôi cá chép trong thời gian 15 ngày, cho thấy hiệu suất chuyển hóa ammonia là 46,3%. Vì vậy, kết quả nghiên cứu của phù hợp với các kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước và các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. trong nghiên cứu này có hiệu suất xử lý ammonia cao hơn và thời gian nhanh hơn các nghiên cứu đã tham khảo, do đó các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. này mang lại nhiều tiềm năng to lớn trong thủy sản nhằm khắc phục hiện trạng ô nhiễm môi trường nuôi trồng thủy sản nói chung và trên tôm hùm nói riêng.

### **3.1.3. Kết quả phân lập vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB) từ mẫu bùn**

#### **3.1.3.1. Kết quả xác định vi khuẩn chuyển hóa ammonia có trong mẫu bùn.**

Tổng số 132 mẫu bùn thu từ lồng nuôi tôm hùm (lồng treo và lồng chìm) trong thời gian 12 tháng nuôi tôm tại vịnh Xuân Đài, thị xã Sông Cầu, tỉnh Phú Yên được pha loãng và chuyển vào môi trường ammonium – calcium – carbonate, các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn này sau khi được ủ ở 28°C khoảng 21 ngày đã được kiểm tra sự hiện diện của NO<sub>2</sub><sup>-</sup> bằng thuốc thử Griess – Ilosway. Phản ứng giữa dung dịch huyền phù vi khuẩn với thuốc thử Griess – Ilosway theo tỷ lệ 1:1:1 có màu hồng đậm hoặc nhạt chứng tỏ có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB) trong môi trường, còn các ống đối chứng âm không cho phản ứng màu (phụ lục 1.3.2)

Sau khi kiểm tra sự hiện diện của nhóm AOB trong 132 mẫu bùn, loại bỏ bớt các mẫu bùn có màu hồng nhạt và có mật độ vi khuẩn từ 10<sup>1</sup> - 10<sup>2</sup> MPN/gam, kết

quả có 21 mẫu bùn có mật độ vi khuẩn nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonium (AOB) nằm trong khoảng từ  $0,9 \times 10^3$  đến  $2,1 \times 10^4$  MNP/g. Kết quả nghiên cứu có sự tương đồng với một số nghiên cứu trước đó về xác định mật độ vi khuẩn nitrate hóa bằng phương pháp MPN như Herbert (1999), khảo sát mật độ vi khuẩn nitrate hóa trong đất cho kết quả khoảng  $10^2$ - $10^4$ MPN/g. Hesselsoe và ctv (2001), thì được khảo sát  $1,79 \times 10^3$  MPN/g. Ngoài ra trong một nghiên cứu khác của Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010), biến động mật độ vi khuẩn nitrate hóa bằng phương pháp MPN trong ao nuôi tôm sú thâm canh dao động từ 7 đến  $2,6 \times 10^3$  MPN/g. Do đó, chọn 21 mẫu bùn có mật độ nhóm AOB từ  $10^3$  MPN/gam trở lên để tiến hành phân lập vi khuẩn (phụ lục 1.3.2).

### **3.1.3.2. Kết quả đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập được**

Từ 21 mẫu bùn có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia, đã phân lập được 60 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa ammonia trong môi trường ammonium – calcium – carbonate. Tất cả 60 chủng vi khuẩn đều có hình dạng khuẩn lạc nhỏ, vụn cao trên môi trường phân lập, dạng tròn đều, màu trắng trong, trắng sữa, trắng đục, vàng đục hoặc màu cam đục, được tiến hành nhuộm Gram để quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000X, kết quả thu được 60 chủng vi khuẩn tế bào có hình cầu hoặc ovan, que ngắn, que dài hoặc hình tròn và tất cả đều là vi khuẩn Gram âm, không sinh bào tử (phụ lục 1.3.2, 1.3.3)

### **3.1.3.3. Kết quả xác định khả năng chuyển hóa $\text{NH}_3$ của các chủng vi khuẩn**

Tất cả các chủng phân lập được có đặc điểm hình thái nghi ngờ thuộc nhóm vi khuẩn AOB được chọn để tiến kiểm tra khả năng chuyển  $\text{NH}_3$  thành  $\text{NO}_2^-$ , dung dịch huyền phù vi khuẩn được chuyển vào môi trường ammonium – calcium – carbonate. Sau 10 ngày kiểm tra khả năng chuyển hóa  $\text{NH}_3$  thành  $\text{NO}_2^-$  của nhóm vi khuẩn AOB bằng thuốc thử là bộ test kit  $\text{NH}_4 \text{NH}_3$  Sera. Trong 60 chủng vi khuẩn được khảo sát có 35 chủng có khả năng chuyển hóa ammonia, 25 chủng vi khuẩn không có khả năng chuyển hóa ammonia (phụ lục 1.3.2). Khả năng chuyển hóa của 35 chủng vi khuẩn sau 10 ngày ở các mức độ khác nhau, trong đó có 10 chủng vi khuẩn KL2, KL10, KL11, KL14, KL15, KL21, KL26, KL30, KL33, KL35 cho

phản ứng màu vàng do sự có mặt của  $\text{NO}_2^-$  nên mức độ chuyển hóa ammonia mạnh, các chủng còn lại cho màu phản ứng màu vàng nhạt hơi xanh lá hơn hoặc có màu xanh dương nên khả năng chuyển hóa được xếp vào mức yếu và không chuyển hóa. Điều này cho thấy mật độ của vi khuẩn AOB đã tăng cao nên khả năng chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  mạnh và trong thời gian ngắn. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Lewis và Pramer (1958), Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010) đã nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm trong bùn ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodo*).

#### 3.1.3.4. Kết quả định danh sinh hóa các chủng vi khuẩn

Sau khi chọn được 10 chủng vi khuẩn ở nội dung 3.1.3.3, tiến hành nhuộm gram, thử catalase, oxidase (phụ lục 1.3.3), các phản ứng sinh hóa trên kit API 20NE và API 20E. Kết quả phản ứng sinh hóa theo kit API 20E và 20NE dành cho vi khuẩn Gram (-) thể hiện Bảng 3.4, 3.5. Theo Stanley và Mandel (1971), vi khuẩn tham gia quá trình nitrite hóa (AOB) bao gồm có 5 nhóm: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosogloea*, *Nitrosospira* và *Nitrosococcus*, hình dạng tế bào *Nitrosocystis*, *Nitrosospira* có dạng hình xoắn trong khi tế bào *Nitrosococcus* có dạng hình tròn. Tuy nhiên theo kết quả nhuộm gram, hầu như là que ngắn và gram âm, do đó không thể nhận định các chủng vi khuẩn thuộc chi *Nitrosomonas*.

**Bảng 3.4.** Một số phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20NE

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn						
	KL2	KL10	KL11	KL14	KL15	KL21	KL26
Gram	-	-	-	-	-	-	-
Thời gian ủ	24-48	24-48	24-48	24-48	24-48	24-48	24-48
$\text{NO}_3^-$ (Khử nitrate)	+	+	+	+	+	-	-
TRP (phản ứng indole)	-	-	-	-	-	-	-
GLU (lên men glucose)	-	-	-	-	-	-	-
ADH (arginine dihydrolase)	-	-	-	-	+	-	-
URE (urease)	-	+	-	-	+	-	+
ESC (esculin)	-	-	-	-	-	+	+
GEL (gelatin)	-	-	-	-	-	+	-
ONPG ( $\beta$ -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;

Tra kết quả trên phần mềm Kit API 20 NE V 8.0, cho thấy chủng vi khuẩn KL2 có độ tương đồng với nhóm vi khuẩn *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* là 99,9%, chủng KL10 có độ tương đồng là 99,9% với chủng vi khuẩn *Ochrobactrum anthropi*, chủng vi khuẩn KL 11 là chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* với độ tương đồng là 82,9%, KL14 là *Pseudomonas fluorescens* có độ tương đồng là 99,1%, chủng KL15 là *Pseudomonas fluorescens* có độ tương đồng là 99,8%, chủng vi khuẩn KL21 có thể thuộc các chi *Burkholderia* hoặc *Sphingomonas* và vi khuẩn KL26 là vi khuẩn *Sphingoacterium multivorum* với độ tương đồng là 99,9%.

**Bảng 3.5.** Một số phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20E

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn		
	KL30	KL33	KL35
Gram	-	-	-
Thời gian ủ	24 - 48 giờ	24 - 48 giờ	24-48 giờ
ONPG ( $\beta$ -galactosidase)	-	-	-
ADH (arginine dihydrolase)	-	-	-
LDC (lysine decarboxylase)	-	-	-
ODC (ornithine decarboxylase)	-	-	-
CIT (citrate)	+	+	-
H <sub>2</sub> S (Hydrogen sunfite)	-	-	-
URE (enzyme urease)	-	-	-
TDA (enzyme tryptophan deaminase)	+	-	-
IND (Indole test)	+	-	-
VP (Voges-Proskauer)	-	+	+
GEL (enzyme gelatin)	-	-	-
GLU (lên men glucose)	+	-	-

MAN (D-Manose)	-	-	-
INO (Inositol)	+	-	-
SOR (Sorbitol)	-	-	-
RHA(rhamnose)	-	-	-
SAC (sucrose)	-	-	-
MEL (melibiose)	-	-	-
AMY (amygdalin)	-	-	-
ARA (arabinose)	-	-	-
OX (oxydase test)	-	-	-

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

Kết quả trên phần mềm API 20E V5.0, cho thấy chủng KL30 là vi khuẩn *Providencia stuartii* với độ tương đồng là 97,5%. Chủng vi khuẩn KL33 có thể xuất hiện 3 chi vi khuẩn đó là *Alcaligenes*, *Moraxella* hoặc *Bordetella* với độ tương đồng là 59,9%. Chủng vi khuẩn KL35 có thể là vi khuẩn *Pseudomonas oryzihabitans* với độ tương đồng là 39,8%.

Sau khi thực hiện phản ứng sinh hóa bằng kit API 20NE và 20E, tra kết quả trên phần mềm API 20E V5.0, API 20NE V 8.0 thì hầu như kết quả đều nhận diện tới loài vi khuẩn. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chỉ dùng kết quả sinh hóa để chọn lọc và nhận diện các chủng vi khuẩn tới chi, để tiếp tục khẳng định tới loài vi khuẩn, tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự gen vùng 16s-rRNA.

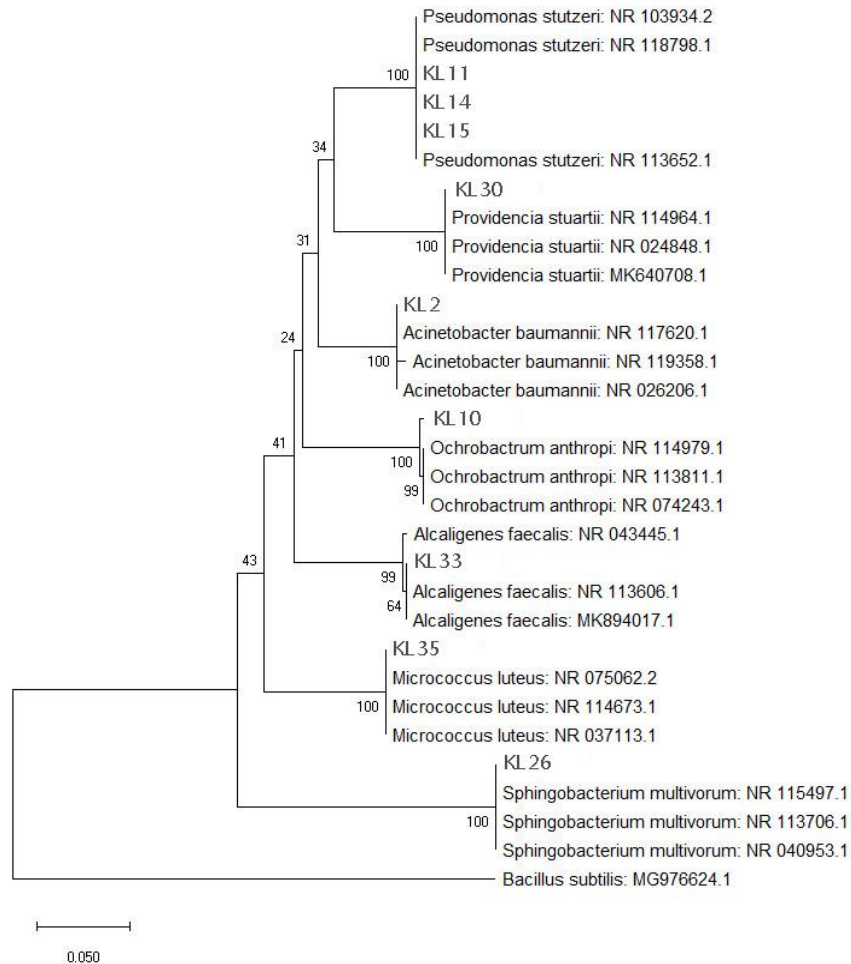
### 3.1.3.5. Kết quả định danh bằng giải trình tự vùng 16S – rRNA

Kết quả định danh sinh học phân tử đã xác định được tên loài của 9 chủng vi khuẩn có độ tương đồng trên 99% - 100% với kết quả Blast trên NCBI, tất cả 9 trình tự vi khuẩn đã được đăng ký trên Genbank.

**Bảng 3.6.** Bảng kết quả định danh phân tử các nhóm vi khuẩn AOB

STT	Chủng vi khuẩn	Tên khoa học	Độ tương đồng	Trình tự tham chiếu	Accession number
1	KL2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99%	CP054302.1	OL764399
2	KL10	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	100%	AB120120.1	OL764398
3	KL11	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%	MT568614.1	OL764400
4	KL14	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%	KY355732.1	OL764401
5	KL15	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%	KY355732.1	OL764402
6	KL26	<i>Sphingoacterium multivorum</i>	100%	LT899971.1	OL764406
7	KL30	<i>Providencia stuartii</i>	100%	MK640708.1	OL764403
8	KL33	<i>Alcaligenes faecalis</i>	100%	CP048039.1	OL764404
9	KL35	<i>Micrococcus luteus</i>	100%	CP033200.1	OL764407

Trên Bảng 3.6 không có kết quả định danh chủng KL21 bởi vì khi so sánh trình tự của chủng vi khuẩn KL21 trên cơ sở dữ liệu của NCBI thì ở độ tương đồng 99%, 100% không xác định được loài vi khuẩn nhưng ở độ tương đồng 98% thì K21 là *Massilia aurea*, do đó không kết luận chủng KL21. Chủng KL10, KL2, KL26, KL30 có kết quả sinh học phân tử và kết quả sinh hóa (3.1.3.4) hoàn toàn trùng khớp nhau, nên có thể kết luận đến loài (Bảng 3.6). Ba chủng KL11, KL14, KL15 có kết quả sinh hóa đều thuộc chi *Pseudomonas*, kết quả định danh vùng 16S – rRNA cho thấy 3 chủng vi khuẩn này có độ tương đồng là 99% và 100% với khoảng 500 nucleotide cho các chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri*.



**Hình 3.3.** Cây phả hệ của các chủng vi khuẩn AOB

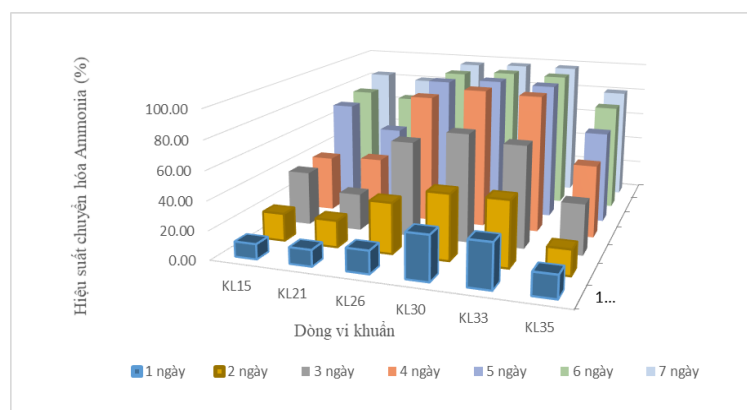
Chủng vi khuẩn KL 33, 35 khi tra các phản ứng trên phần mềm API thì bảng kết quả có khá nhiều chi khác nhau, độ tương đồng các chi cũng rất thấp, do đó kết

quả sinh hóa không thể kết luận được các chủng vi khuẩn đó thuộc chi nào. Khi tiếp tục thực hiện phương pháp giải trình tự vùng 16S – rRNA thì chủng vi khuẩn KL33 cho kết quả trùng với kết quả sinh hóa ở chi *Alcaligenes*, do đó chủng KL 33 có thể sử dụng kết quả định danh là vi khuẩn *Alcaligenes faecalis*. Riêng chủng vi khuẩn KL35 cho kết quả không giống nhau giữa hai phương pháp, tuy nhiên khi sử dụng phương pháp giải trình tự vùng 16s rRNA cho kết quả *Micrococcus luteus* với độ tương đồng 99%.

Cây cây phả hệ ở hình 3.3 được vẽ theo phương pháp Neighbor joining bằng phần mềm MEGA X với độ tin cậy là 1000 lần lặp lại thể hiện ở vùng gen được giải trình tự hầu như không phát sinh loài có họ hàng gần hay loài khác, Các trình tự gen của 9 chủng vi khuẩn phân lập được phân nhóm với các trình tự tham chiếu trên NCBI có hệ số bootstrap đạt 99% - 100%. Do đó, đã xác định được 9 loài vi khuẩn AOB có khả năng chuyển hóa ammonia thể hiện ở bảng 3.6.

### 3.1.3.6. Kết quả đánh giá khả năng chuyển hóa ammonia của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Tất cả 10 chủng vi khuẩn sau khi bổ sung vào môi trường chứa  $\text{NH}_4^+$ , các chủng được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Mẫu được thu tại các thời điểm 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 7 ngày để xác định nồng độ  $\text{NO}_2^-$ . Thu được 6 chủng vi khuẩn có hiệu suất chuyển hóa trên 80% và 4 chủng vi khuẩn chuyển hóa ammonia dưới 80% (bảng 1.6, phụ lục 1.3.6).



**Hình 3.4.** Hiệu suất phân giải  $\text{NH}_4^+$  của các chủng vi khuẩn

Hình 3.4 thể hiện 6 chủng vi khuẩn chuyển hóa ammonia trên 80%. Sau 1 ngày hiệu suất chuyển hóa ammonia của các chủng vi sinh vật còn thấp, điều này có

thể lý giải là do vi khuẩn mới chuyển từ môi trường tăng sinh LB sang môi trường ammonium – calcium – carbonat nên cần thời gian để quen dần môi trường mới. Sau 2 ngày, hiệu suất của quá trình chuyển hóa  $\text{NH}_4^+$  thành  $\text{NO}_2^-$  đã bắt đầu tăng lên một lượng nhỏ so với ngày thứ 1, chủng vi khuẩn KL26, KL30 và chủng vi khuẩn KL33 có hiệu suất phân giải  $\text{NH}_4^+$  cao hơn so với chủng vi khuẩn còn lại. Đến ngày thứ 3, hiệu suất xử lý của tất cả các chủng vi khuẩn đều bắt đầu tăng nhanh, cho thấy các chủng vi khuẩn đã thích nghi được với môi trường và đang hoạt động nhanh, mạnh hơn. Sau 4 ngày, vi khuẩn chuyển hóa ammonia hoạt động mạnh hơn, hiệu suất chuyển hóa ammonia của chủng vi khuẩn KL26 đạt trên 90% và vi khuẩn KL 30, 33 đạt trên 95%. Từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 7 thì chủng vi khuẩn KL26, KL30, KL33 hầu như hiệu suất chuyển hóa ammonia không thay đổi và đối với các chủng KL15, KL21, KL 35 thì đạt hiệu suất xử lý trên 80%. Dựa vào kết quả định danh mục 3.1.3.5 có thể kết luận vi khuẩn *Sphingoacterium multivorum* KL26, *Providencia stuartii* KL30, *Alcaligenes faecalis* KL33 có sự chuyển hóa ammonia nhanh nhất trong thời gian 4 ngày (84 giờ) với hiệu suất xử lý trên 90%. Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 và *Micrococcus luteus* KL35 có hiệu suất chuyển hóa ammonia trên 80% trong 7 ngày. Tác giả Joo (2005) và ctv đã nghiên cứu chủng vi khuẩn *Alcaligenes faecalis* No.4 có tham gia vào quá trình nitrate hóa và khử nitrate trong điều kiện hiếu khí. Một nghiên cứu của Su và ctv (2006), Joo và ctv (2006) đã phân lập vi khuẩn *Pseudomonas* sp. và *Alcaligenes faecalis* là 2 loài vi khuẩn dị dưỡng, nitrate hóa và phản nitrate-hóa trong điều kiện có oxy và họ đã ứng dụng chúng trong việc loại bỏ N trong nước thải trại chăn nuôi ở Đài Loan và Hàn Quốc rất thành công, kết quả trên phù hợp với nghiên cứu chọn lọc nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia trong bùn nuôi tôm hùm. Zhao và ctv, 2010 đã phân lập và định danh chủng vi khuẩn *Providencia rettgeri* có khả năng chuyển hóa được  $\text{NH}_4^+$  qua  $\text{NO}_2^-$  khoảng 44,5%. Tran và ctv (2019), đã phân lập 6 chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* sp. ở các hồ nuôi tôm thẻ và sú ở Sóc Trăng có khả năng chuyển hóa ammonia với hiệu suất 100% trong 96 giờ. Phạm Thị Tuyết Ngân và ctv (2020), đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn chuyển hóa ammonia ở tôm thẻ chân trắng, chủng TB7.2 có khả năng oxy hóa ammonia tốt nhất đạt 39,02%, chủng



TV4.2 có hiệu suất oxy hóa nitrite đạt đến 27,8% sau 5 ngày, các chủng vi khuẩn đều gram âm. Zhang (2020), phân lập và định danh 4 chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., và *Sphingobacterium* sp. có khả năng chuyển hóa ammonia trong 24 giờ với hiệu suất 91,32% trong xử lý nước thải chăn nuôi. Tác giả Lê Công Tuấn và ctv (2021), đã phân lập được hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas* (BF01 và BF03) và 1 chủng vi khuẩn *Cupriavidus oxalaticus* BF02 từ nước biển tỉnh Thừa Thiên Huế, Việt Nam. Các nghiên cứu cho thấy các chủng vi khuẩn này có khả năng loại bỏ các hợp chất nitơ như amoni, nitrit và nitrat trong môi trường nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu có sự tương đồng với các nghiên cứu đã thực hiện trong và ngoài nước về các chủng vi khuẩn chuyển hóa ammonia trong nước thải và nước nuôi tôm. Ngoài ra, kết quả khả năng chuyển hóa ammonia của các chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu bùn ở Vịnh Xuân Đài có hiệu suất xử lý và thời gian chuyển hóa ammonia nhanh hơn các nghiên cứu đã tham khảo ngoại trừ nghiên cứu của tác giả Tran và ctv (2019).

### **3.1.4. Kết quả phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite từ mẫu bùn**

#### **3.1.4.1. Kết quả xác định vi khuẩn chuyển hóa nitrite có trong mẫu bùn.**

Tổng số 132 mẫu bùn thu từ lồng nuôi tôm hùm (lồng treo và lồng chìm) trong thời gian 12 tháng nuôi tôm tại vịnh Xuân Đài, thị xã Sông Cầu, tỉnh Phú Yên. Phản ứng giữa dung dịch huyền phù vi khuẩn với thuốc thử Griess – Ilosway có màu trắng chứng tỏ có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB) trong môi trường, còn các ống đối chứng âm màu hồng đậm (phụ lục 1.4.2).

Kết quả phân tích chỉ số MPN cho thấy, 22 mẫu bùn có mật độ vi khuẩn NOB khoảng  $10^2$ - $10^5$  MPN/g tại vùng đáy vịnh Xuân Đài, khá tương đồng với các nghiên cứu khác ở trong và ngoài nước. Theo nghiên cứu về mật độ nhóm NOB trong đất của một số tác giả như Degrange và Bardin (1995) đếm quần thể NOB từ đất bằng phương pháp PCR nằm trong khoảng  $10^1$ ,  $10^2$  hoặc  $10^3$  CFU/g. Ngoài ra, Rennie và Schmidt (1977) cho biết mật độ của chúng cao hơn, từ  $10^3$ - $10^4$  CFU/g. Ở Việt Nam, Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010) cũng nghiên cứu khảo sát về biến động nhóm nitrite hóa bằng phương pháp MPN trong ao nuôi tôm sú thâm canh với mức dao động từ 5,5 đến  $2,6 \times 10^3$  MPN/g. Hoạt động của NOB giảm ngay

sau khi tiếp xúc với ánh nắng mặt trời (Degrange và Bardin, 1995) 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  $\text{NH}_3$  và pH cao; oxy hòa tan (DO) và  $\text{NO}_2^-$  thấp, nhiệt độ thấp (Rennie và Schmidt, 1997). Ngoài ra, NOB bị giới hạn mạnh bởi cường độ và thời gian chiếu sáng chủ yếu là ánh sáng xanh dương và tím (Olson, 1981). Trong các ao nuôi thủy sản, NOB được xác định mắc 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 (Vanzella và ctv, 1985). Sau khi kiểm tra sự hiện diện của nhóm NOB trong 132 mẫu bùn, loại bỏ bớt các mẫu bùn có màu hồng đậm và có mật độ vi khuẩn NOB dưới  $10^2$  MPN/g, chọn được 22 mẫu bùn có mật độ nhóm NOB từ  $10^2$  MPN/g trở lên để tiến hành phân lập vi khuẩn nhóm NOB.

#### **3.1.4.2. Kết quả đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập được**

Từ 22 mẫu bùn có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite, đã phân lập được 50 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite trong môi trường nitrite – calcium – carbonate agar. Tất cả 50 chủng vi khuẩn đều có khuẩn lạc nhỏ, lồi, nhày vụn cao trên môi trường phân lập, dạng tròn đều, màu trắng trong, trắng sữa, trắng đục, vàng đục và được tiến hành nhuộm Gram để quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000X, kết quả thu được 10 chủng vi khuẩn tế bào có hình cầu, gram âm và 40 chủng vi khuẩn có hình dạng que ngắn, que dài, trong đó có 25 chủng vi khuẩn Gram âm, 15 chủng vi khuẩn gram dương.

#### **3.1.4.3. Kết quả xác định khả năng chuyển hóa $\text{NO}_2^-$ của các chủng vi khuẩn**

Tất cả các chủng phân lập được có đặc điểm hình thái nghi ngờ thuộc nhóm vi khuẩn NOB được chọn để tiến kiểm tra khả năng chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  thành  $\text{NO}_3^-$ . Sau 10 ngày kiểm tra khả năng chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  thành  $\text{NO}_3^-$  của nhóm vi khuẩn NOB bằng thuốc thử là bộ test kit  $\text{NO}_2$  Sera. Trong 50 chủng vi khuẩn được khảo sát có 40 chủng có khả năng chuyển hóa nitrite, 10 chủng vi khuẩn không có khả năng chuyển hóa nitrite. Trong 40 chủng vi khuẩn, cho thấy khả năng chuyển hóa của các chủng vi khuẩn ở các mức độ khác nhau trong 10 ngày, trong đó có 16 chủng vi khuẩn CKT, C<sub>2</sub>/1, C<sub>2</sub>/2, C<sub>3</sub>/1, C<sub>4</sub>/2, C<sub>8</sub>/1, C<sub>9</sub>/1, C<sub>10</sub>, TKT, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>/2, T<sub>3</sub>/1, T<sub>4</sub>/1, T<sub>5</sub>/3, T<sub>7</sub>/3, T<sub>9</sub> khi phản ứng với bộ test kit cho phản ứng màu vàng do sự có

mặt của  $\text{NO}_3^-$  nên mức độ chuyển hóa nitrite mạnh nên không còn có nitrite, các chủng còn lại cho màu phản ứng màu cam hay màu đỏ nhạt nên khả năng chuyển hóa được xếp vào mức yếu (phụ lục 1.4.2).

#### 3.1.4.4. Kết quả định danh sinh hóa các chủng vi khuẩn

Sau khi chọn được 16 chủng vi khuẩn từ mục 3.1.4.3, tiến hành nhuộm gram, thử catalase, oxidase và các phản ứng sinh hóa trên kit API. Trong đó có 10 chủng vi khuẩn là Gram (+) và 6 chủng vi khuẩn gram (-).

Tiến hành định danh bằng phản ứng sinh hóa theo kit API 20E, 20NE sử dụng cho vi khuẩn Gram (-), kit Coryne sử dụng cho Gram (+) thể hiện Bảng 3.11, 3.12 và 3.13. Kit API 20E sử dụng cho nhóm vi khuẩn gram âm có phản ứng oxidase âm tính, API 20NE sử dụng cho nhóm vi khuẩn gram âm có phản ứng oxidase dương tính. Theo Stanley và Mandel (1971), *Nitrobacter*, *Nitrospina* và *Nitrosococcus* là 3 nhóm vi khuẩn tham gia vào giai đoạn nitrite hóa, chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  sang  $\text{NO}_3^-$  nhưng theo tác giả này 3 loài vi khuẩn trên khác nhau về hình dạng tế bào. *Nitrobacter* có dạng hình que ngắn, trong khi *Nitrospina* có dạng hình que dài và *Nitrosococcus* có dạng hình cầu lớn. Tuy nhiên theo kết quả nghiên cứu hình thái thì hình dạng khuẩn lạc và hình dạng Gram hầu như là que ngắn và gram âm hay gram dương, không thể nhận định chi vi khuẩn dựa trên hình thái khuẩn lạc, do đó 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, API Coryne***

Kết quả Bảng 3.7 cho thấy khi tra phần mềm API 20E V5.0, thì cả 4 chủng vi khuẩn TKT, T<sub>2</sub>/2, C<sub>2</sub>/2, C<sub>4</sub>/2 có độ tương đồng với chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* là 96,7%. Hai chủng vi khuẩn T<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>/1 có độ tương đồng 99,7% với chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia*.

**Bảng 3.7.** Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20E.

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn					
	TKT	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> /2	C <sub>2</sub> /2	C <sub>3</sub> /1	C <sub>4</sub> /2
ONPG ( $\beta$ -galactosidase)	+	+	+	+	+	+
ADH (arginine dihydrolase)	-	-	-	-	-	-
LDC (lysine decarboxylase)	-	+	-	-	+	-

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn					
	<i>TKT</i>	<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>2/2</sub></i>	<i>C<sub>2/2</sub></i>	<i>C<sub>3/1</sub></i>	<i>C<sub>4/2</sub></i>
ODC (ornithine decarboxylase)	-	-	-	-	-	-
CIT (citrate)	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S (Hydrogen sunfite)	-	-	-	-	-	-
URE (enzyme urease)	-	-	-	-	-	-
TDA (enzyme tryptophan deaminase)	-	+	-	-	+	-
IND (Indole test)	-	-	-	-	-	-
VP (Voges-Proskauer)	-	-	-	-	-	-
GEL (enzyme gelatinase)	+	+	+	+	+	+
GLU (lên men glucose)	-	-	-	-	-	-
MAN (D-Manose)	-	-	-	-	-	-
INO (Inositol)	-	-	-	-	-	-
SOR (Sorbitol)	-	-	-	-	-	-
RHA(rhamnose)	-	-	-	-	-	-
SAC (sucrose)	-	-	-	-	-	-
MEL (melibiose)	-	-	-	-	-	-
AMY (amygdalin)	-	-	-	-	-	-
ARA (arabinose)	-	-	-	-	-	-
OX (oxidase test)	-	+	-	-	+	-

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

**Bảng 3.8.** Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20NE.

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn			
	<i>T<sub>3/1</sub></i>	<i>T<sub>4/1</sub></i>	<i>CKT</i>	<i>C<sub>2/1</sub></i>
NO <sub>3</sub> (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.

Bảng 3.8, tra phần mềm API 20NE V8.0, cho thấy 2 chủng vi khuẩn CKT và C<sub>2</sub>/1 có độ tương đồng 99,8% với chủng vi khuẩn *Chryseobacterium indologenes*. Chủng vi khuẩn T<sub>3</sub>/1 có độ tương đồng 72,5% với chủng vi khuẩn *Delftia acidovorans*. Chủng vi khuẩn T<sub>4</sub>/1 có độ tương đồng 90,9% với chủng vi khuẩn *Acinetobacter junii/johnsonii*.

**Bảng 3.9.** Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API Coryne

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn					
	C <sub>8</sub> /1	C <sub>9</sub> /1	C <sub>10</sub>	T <sub>5</sub> /3	T <sub>7</sub> /3	T <sub>9</sub>
NO <sub>3</sub> (khử nitrate)	+	-	-	+	+	+
PYZ (Pyrazinamidase)	+	+	-	+	+	-
PYRA (Pyrrolidonyl arylamidase)	-	+	-	-	-	-
PAL (Alkaline – phosphatase)	-	+	-	+	+	-
Beta -GUR (beta- glucuronidase)	-	-	-	-	-	-
Beta -GAL (beta – galactosidase)	+	+	+	-	-	-
Alpha -GUL (alpha – glucosidase)	-	+	-	+	+	+
Beta -NAG (N – acetyl – beta – glucosidase)	-	-	+	-	-	-
ESC (thủy phân esculin)	+	+	+	+	+	+
URE (Thủy phân Ure)	-	-	-	-	+	-
GEL (thủy phân gelatinase)	+	+	-	+	-	-
Control (control fermentation)	-	-	-	-	-	-
GLU (lên men D-Glucose)	-	-	+	+	+	-
RIB (lên men D-ribose)	-	-	-	+	-	-
XYL (lên men D-xylose)	-	-	-	-	-	-
MAN (lên men D-mannitol)	-	-	+	-	-	-
MAL (lên men maltose)	-	+	+	+	-	-
LAC (lên men lactose)	-	-	-	+	-	-
SUR (lên men sucrose)	-	+	+	+	-	-
GLYG (lên men glycogen)	-	-	-	-	-	-
CAT (catalase)	+	+	+	+	+	+

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

Trên Bảng 3.9, tất cả các chủng vi khuẩn gram dương đều có phản ứng catalase dương tính, thủy phân gelatine. Tra phần mềm API Coryne V4.0 thấy rằng chủng vi khuẩn C<sub>8</sub>/1 này có độ tương đồng 89,2% với chi vi khuẩn *Arthrobacter*

spp., chủng vi khuẩn C<sub>9</sub>/1 có độ tương đồng 98,7% với chi *Brevibacterium* spp., chủng vi khuẩn C<sub>10</sub> có độ tương đồng 99,5% với chủng vi khuẩn *Propionibacterium avidum*, chủng vi khuẩn T<sub>5</sub>/3 tương đồng với 68,5% với nhóm *Cellulomonas spp./Microbacterium* spp., chủng vi khuẩn T<sub>7</sub>/3, T<sub>9</sub> tương đồng với nhóm vi khuẩn *Rhodococcus* spp. lần lượt là 92,9% và 94,3%. Kết quả định danh sinh hóa khi kiểm tra trên phần mềm đều cho kết quả tới loài của các chủng vi khuẩn, tuy nhiên, trong nghiên cứu này chỉ dùng kết quả sinh hóa để chọn lọc và nhận diện các chủng vi khuẩn tới chi, để tiếp tục khẳng định tới loài vi khuẩn, tiến hành định danh bằng phương pháp phân tích trình tự gen vùng 16s-rRNA.

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

Kết quả định danh sinh học phân tử đã xác định được tên loài của 16 chủng vi khuẩn có độ tương đồng trên 98% - 100% với kết quả Blast trên NCBI, tất cả các trình tự vi khuẩn đã được đăng ký trên Genbank.

**Bảng 3.10.** Kết quả định danh 16 chủng vi khuẩn NOB

STT	Chủng vi khuẩn	Tên khoa học	Độ tương đồng	Trình tự tham chiếu	Accession number
1	CKT	<i>Chryseobacterium gleum</i>	100%	LR134289.1	OL774697
2	C <sub>2</sub> /1	<i>Chryseobacterium gleum</i>	100%	LR134289.1	OL774698
3	C <sub>2</sub> /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%	MN443620.1	OL774693
4	C <sub>3</sub> /1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%	CP047310.1	OL774699
5	C <sub>4</sub> /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%	MN443620.1	OL774694
6	C <sub>8</sub> /1	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	98%	KC178593.1	OL774687
7	C <sub>9</sub> /1	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	GU998818.1	OL774688
8	C <sub>10</sub>	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	99%	HM854234.1	OL774689
9	TKT	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99%	MN443620.1	OL774695
10	T <sub>1</sub>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%	FJ811968.1	OL774699
11	T <sub>2</sub> /2	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	100%	MZ436651.1	OL774696
12	T <sub>3</sub> /1	<i>Delftia lacustris</i>	99%	CP065748.1	OL774701
13	T <sub>4</sub> /1	<i>Acinetobacter junii</i>	99%	MK089549.1	OL774702
14	T <sub>5</sub> /3	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99%	KU161293.1	OL774690
15	T <sub>7</sub> /3	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	99%	KP217189.1	OL774691
16	T <sub>9</sub>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99%	KF803583.1	OL774692

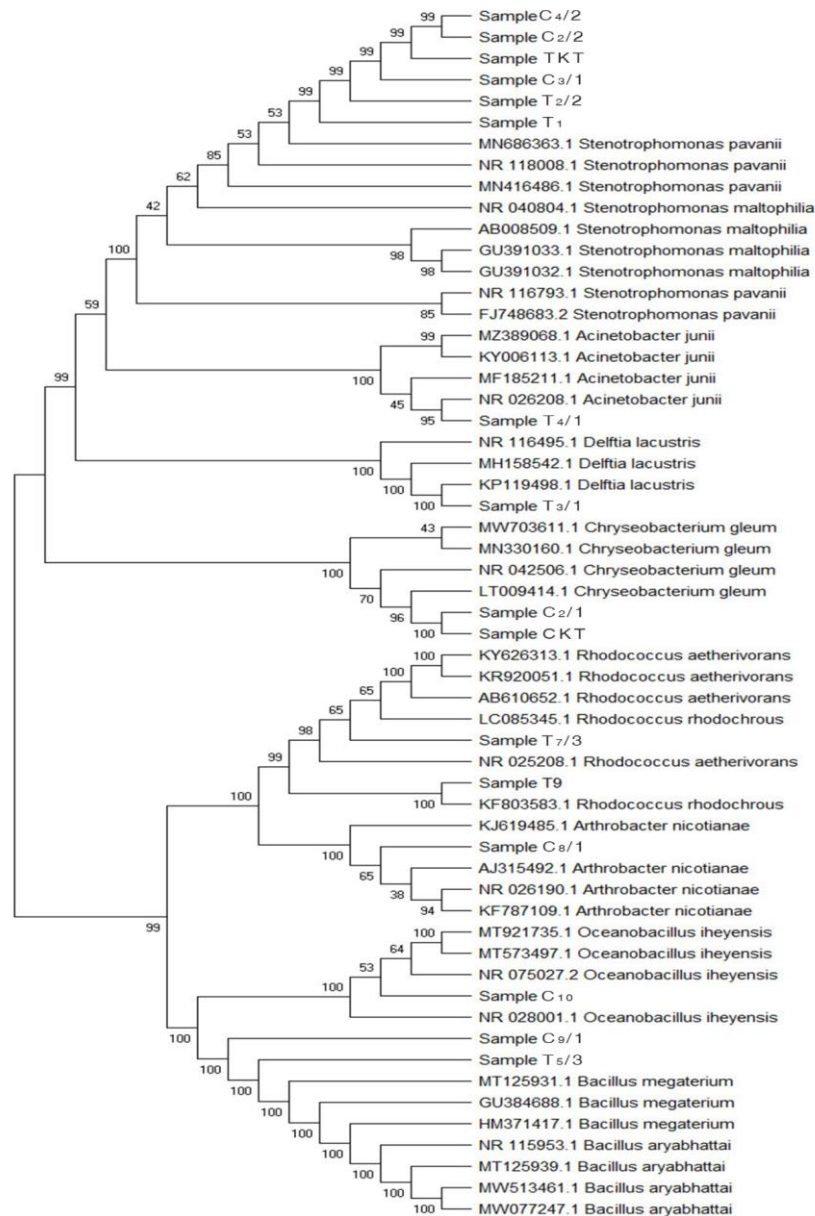
Kết quả định danh ở bảng 3.10, chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas pavanii* có độ tương đồng 99% - 100% với kết quả

BLAST trên cơ sở dữ liệu của NCBI và kết quả sinh hóa trên kit API 20E, 20NE cho thấy cả 6 chủng vi khuẩn đều là *Stenotrophomonas maltophilia*. Trên cây phả hệ hình 3.5, cho thấy các chủng vi khuẩn TKT, T<sub>2</sub>/2, C<sub>2</sub>/2, C<sub>4</sub>/2, C<sub>3</sub>/1 và T<sub>1</sub> tách thành một nhánh riêng với 2 chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, có hệ số bootstraps 85% với chủng vi khuẩn MN416486.1 *Stenotrophomonas pavanii*, tiếp tục so sánh với hai trình tự NR116793.1, JF748683.2 *Stenotrophomonas pavanii* với hệ số bootstraps 100%. Tham khảo kết quả nghiên cứu của tác giả Urszula và ctv (2009), Ramos và ctv (2011), thực hiện nuôi 6 chủng vi khuẩn trên môi trường có sự hiện diện của muối NaCl 4,5% và ủ ở nhiệt độ 42°C thì hai chủng vi khuẩn C<sub>3</sub>/1 và T<sub>1</sub> mọc trên môi trường (phụ lục 1.4.5), còn 3 chủng vi khuẩn TKT, C<sub>2</sub>/2, C<sub>4</sub>/2, không thấy xuất hiện trên môi trường hay chủng T<sub>2</sub>/2 khoảng 10 khuẩn lạc có thể nhận định chủng vi khuẩn C<sub>3</sub>/1 và T<sub>1</sub> là *Stenotrophomonas maltophilia* và các chủng vi khuẩn TKT, T<sub>2</sub>/2, C<sub>2</sub>/2, C<sub>4</sub>/2 là *Stenotrophomonas pavanii*.

Kết quả định danh bằng phương pháp phân tích trình tự gen 16s – rRNA của 2 chủng vi khuẩn C<sub>9</sub>/1, T<sub>5</sub>/3 là *Bacillus megaterium*, *Bacillus aryabhatai*. Kết quả sinh hóa phần 3.1.4.4 và sinh học phân tử của hai chủng vi khuẩn C<sub>9</sub>/1, T<sub>5</sub>/3 có sự khác nhau về chi và loài vi khuẩn. Do đó, đã thực hiện thêm 1 số phản ứng sinh hóa theo khóa phân loại Bergey, cho thấy hai chủng có phản ứng thủy phân tinh bột, thủy phân casein, phản ứng citrate dương tính và phát triển ở nồng độ NaCl 6,5%, sinh bào tử, do đó có thể kết luận 2 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* (phụ lục 1.4.4). Ngoài ra, trên cây phả hệ, cho thấy hai chủng vi khuẩn C<sub>9</sub>/1, T<sub>5</sub>/3 tạo nhánh với trình tự hai chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium*, *Bacillus aryabhatai* với độ tin cậy 100%. Do đó, có thể kết luận kết quả định danh của 2 chủng vi khuẩn theo bảng 3.10. Chủng vi khuẩn C<sub>10</sub> cũng có kết quả sinh hóa và sinh học phân tử khác nhau về chi vi khuẩn, tuy nhiên trên cây phả hệ cho thấy C<sub>10</sub> phân nhánh với trình tự vi khuẩn NR 028001.1 *Oceanobacillus iheyensis* với độ tin cậy 100%. Do đó có thể kết luận kết quả định danh chủng vi khuẩn này theo bảng 3.10.

Dựa vào kết quả sinh hóa và kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cùng với cây phả hệ ở hình 3.5, thấy các chủng vi khuẩn cùng nhánh di truyền, không phát sinh

loài mới, có độ tin cậy cao với các trình tự vi khuẩn tham chiếu, có thể khẳng định chủng vi khuẩn CKT và C<sub>2</sub>/1 là *Chryseobacterium gleum*, chủng T<sub>3</sub>/1 là *Delftia lacustris*, chủng ký hiệu T<sub>4</sub>/1 là *Acinetobacter junii*, chủng vi khuẩn C<sub>8</sub>/1 là *Arthrobacter nicotianae*, T<sub>7</sub>/3 là *Rhodococcus aetherivorans* và T<sub>9</sub> là *Rhodococcus rhodochrous*.



**Hình 3.5.** Cây phả hệ của các chủng vi khuẩn NOB

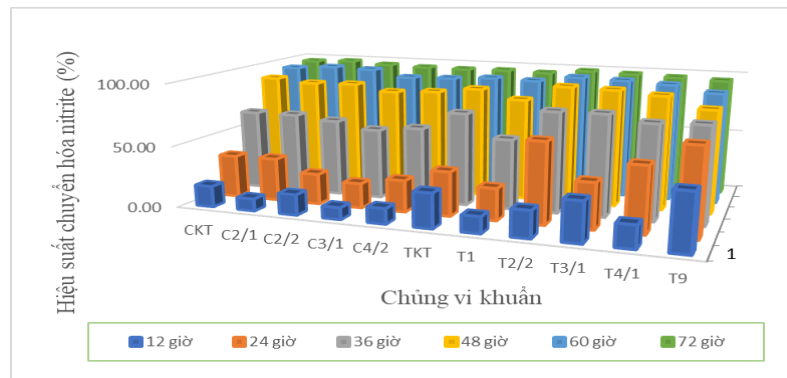
Theo tác giả Phạm Thị Tuyết Ngân và ctv (2011), *Nitrosomonas nitrosa* và *Nitrobacter winogradskyi* là 2 loài vi khuẩn nitrite hóa hiện diện trong ao nuôi tôm sú thâm canh, phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác là nhóm vi khuẩn NO<sub>2</sub><sup>-</sup>



bao gồm 5 giống khác nhau: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosobrio*, *Nitrozolobus* và *Nitrospira* (Waston và ctv, 1989; Bock and Koops, 1992; Herbert, 1999). 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*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Arthrobacter nicotianae*, *Rhodococcus aetherivorans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus aryabhatai*, *Oceanobacillus iheyensis* là các chủng chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  trong môi trường nước mặn được phân lập từ bùn đáy ở vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. Kết quả phân lập vi khuẩn chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  khác với một số nghiên cứu phân lập vi khuẩn chuyển hóa trong ao tôm thẻ chân trắng, tôm sú trong nước và thế giới. Hiện nay, những nghiên cứu về nhóm vi sinh vật chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  trong bùn nuôi tôm hùm còn rất hạn chế, các loài vi khuẩn đã được xác định trong nghiên cứu này hiện vẫn chưa được đề cập đến việc chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  trong nuôi trồng thủy sản, tuy nhiên có một số nghiên cứu trên thế giới đã minh chứng đặc tính của vi khuẩn *Acinetobacter* sp. có khả năng chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  trong bùn của nước thải xử lý thực vật (Li, 2019), chủng vi khuẩn *Delftia lacustris* có khả năng phân hủy chất peptidoglycan trong tự nhiên (Jørgensen và ctv, 2009), chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* có khả năng sử dụng các hợp chất thơm (Urszula và ctv, 2009), chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* phân lập từ thân của một giống mía ở Brazil có khả năng cố định Nitơ (Ramos và ctv, 2011), chủng vi khuẩn *Chryseobacterium gleum* phân hủy dầu mỏ tại các vùng đất nhiễm xăng dầu (Đinh Thị Vân và Ngô Cao Cường, 2018), chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. được sử dụng làm probiotic cho cá hồng cam (*Puntius conchonus*), kết quả tăng trưởng về chiều dài, chiều rộng, trọng lượng của cá hơn hẳn nghiệm thức đối chứng, ngoài ra, màu sắc trong mô cá cũng khác so với đối chứng (Vianey và ctv, 2016). Chủng vi khuẩn *Rhodococcus ruber* tạo chất hoạt hóa bề mặt sinh học đã được phân lập tại nước ô nhiễm dầu ven biển Vũng Tàu (Lại Thị Hiền và ctv, 2013).

### 3.1.4.6. Kết quả đánh giá khả năng chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Sau khi định danh các chủng vi khuẩn, 16 chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường định lượng nitrite, khảo sát từ 12 giờ - 72 giờ (bảng 1.10, phụ lục 1.4.6 trình bày sai số và trắc nghiệm phân hạng theo thời gian giữa các nghiệm thức). Hình 3.6 cho thấy khả năng chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  của nhóm vi khuẩn bắt đầu thích nghi ở giai đoạn 24 giờ, bắt đầu tăng cao sau 36 giờ. Ở thời điểm 48 giờ, hiệu suất xử lý của các chủng vi khuẩn đều tăng lên và đạt trên 80%, đến giai đoạn 60 -72 giờ thì hiệu suất chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  tăng nhẹ và đường biểu diễn gần như nằm ngang.



**Hình 3.6.** Hiệu suất chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  của các chủng vi khuẩn

Sau 72 giờ, hiệu suất chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn là từ 66,5% - 98,21%, trong đó có 11 chủng vi khuẩn CKT, C<sub>2</sub>/1, C<sub>2</sub>/2, C<sub>3</sub>/1, C<sub>4</sub>/2, TKT, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>/2, T<sub>3</sub>/1, T<sub>4</sub>/1, T<sub>9</sub> hiệu suất chuyển hóa nitrite trên 95%, chủng vi khuẩn T<sub>2</sub>/2 có hiệu suất xử lý cao nhất (98,21%) và chủng thấp nhất là T<sub>9</sub> (95,05%). Theo Nguyễn Văn Minh (2012) đã phân lập tuyển chọn chủng vi khuẩn chuyển hóa nitrite 84,17% trong thời gian 7 ngày trong nước nuôi trồng thủy sản. 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). So sánh kết quả của nghiên cứu với các tác giả trên, các chủng vi khuẩn NOB trong nghiên cứu này có khả năng chuyển hóa chậm hơn các chủng vi khuẩn từ nước thải chăn nuôi, nhưng lại có kết quả chuyển hóa nitrite tốt hơn chủng vi khuẩn cùng phân lập trong nước nuôi trồng thủy sản. Ngoài ra, đối với

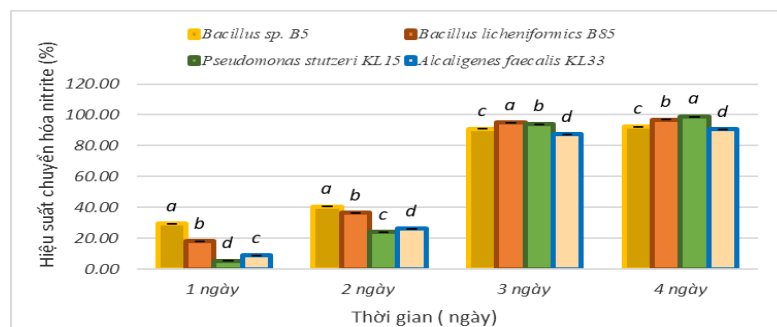
các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitrite được phân lập tại nền đáy Vịnh Xuân Đài thì có kết quả tương tự với nghiên cứu của nhóm tác giả Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Thị Trúc Mai (2019), cho rằng nhóm vi khuẩn chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  được phân lập tại ao tôm thẻ chân trắng ở Bạc Liêu cho hiệu suất xử lý  $\text{NO}_2^-$  là 97,2% trong thời gian 3 ngày. Theo tác giả Shu Ma (2021), chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. phân lập từ nước thải lợn, chuyển hóa 85% ammonia với tốc độ là 3,4 mg/L ammonia trong 1 giờ. Do đó, để đánh giá được thời điểm xử lý  $\text{NO}_2^-$  mạnh nhất của từng chủng vi khuẩn cần phải tiến hành khảo sát tại các mốc thời gian liên tiếp nhau. Kết quả định lượng  $\text{NO}_2^-$  thấy, khả năng xử lý nitrite 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.

### 3.1.5. Khảo sát khả năng chuyển hóa các hợp chất chứa nitơ và khả năng chịu mặn của các nhóm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, AOB và NOB.

Sau khi đã phân lập và định danh 5 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* chuyển hóa ammonia trên 95%, 5 chủng vi khuẩn AOB chuyển hóa trên 80% và 11 chủng NOB chuyển hóa nitrite trên 95%, nhằm lựa chọn nhóm vi khuẩn để tiến hành cho nội dung 2, nhân sinh khối tạo chế phẩm vi sinh ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản, tiến hành đánh giá các đặc tính khác của 21 chủng vi khuẩn trên như chuyển hóa các hợp chất chứa nitơ và khả năng chịu mặn ở nồng độ muối khác nhau.

#### 3.1.5.1. Khảo sát khả năng chuyển hóa $\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}_3^-$ và khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn *Bacillus*, vi khuẩn AOB.

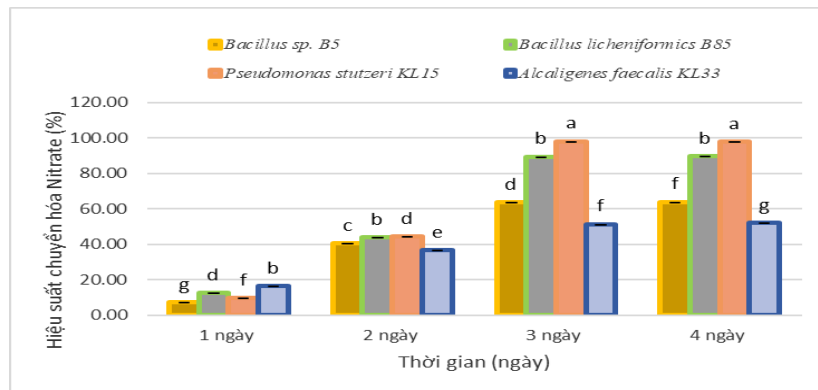
Kết quả định tính (bảng 1.11, phụ lục 1.6) cho thấy có 4 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa cả  $\text{NO}_2^-$  và  $\text{NO}_3^-$ , đó là các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B5, *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Alcaligenes faecalis* KL33.



**Hình 3.7.** Hiệu suất chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  của 4 chủng vi khuẩn

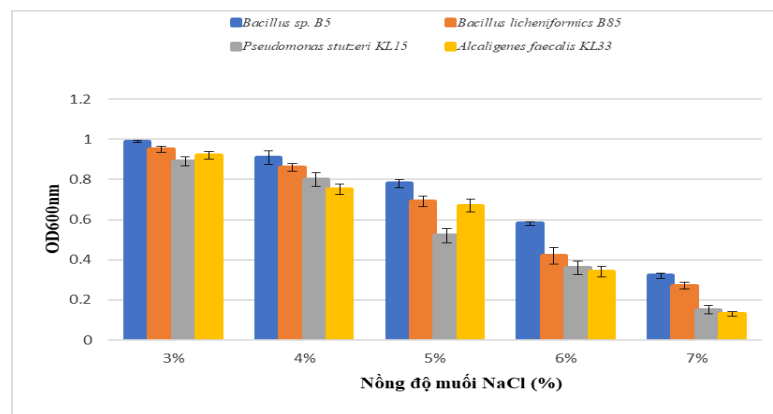
Tiến hành định lượng khả năng chuyển hóa nitrite và nitrate của 4 chủng vi khuẩn, kết quả hình 3.7 cho thấy hiệu suất chuyển hóa nitrite của các nhóm vi khuẩn tăng sau hai ngày và tất cả các chủng vi khuẩn đều có hiệu suất chuyển hóa trên 90% sau 4 ngày. Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Bacillus licheniformis* B85 chuyển hóa nitrite sau 4 ngày với hiệu suất là 99,06% và 96,97%.

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B5, *Alcaligenes faecalis* KL33 có hiệu suất chuyển hóa nitrite trên 90% trong thời gian 4 ngày.



**Hình 3.8.** Hiệu suất chuyển hóa  $\text{NO}_3^-$  của 4 chủng vi khuẩn

Kết quả hình 3.8 cho thấy hiệu suất chuyển hóa nitrate của các nhóm vi khuẩn tăng sau hai ngày, tăng mạnh từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 3 và đến ngày thứ tư thì hầu như không tăng. Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Bacillus licheniformis* B85 có khả năng chuyển hóa nitrate cao nhất sau 4 ngày với hiệu suất là 98,02 %, 89,63%. Hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B5, *Alcaligenes faecalis* KL33 có hiệu suất chuyển hóa nitrate là 63,87%, 52,12% sau 4 ngày.



**Hình 3.9.** Khả năng sống ở các nồng độ NaCl của 4 chủng vi khuẩn

Hình 3.9 (phụ lục 1.6 – bảng 1.16) cho thấy 4 chủng vi khuẩn đều có khả năng sống ở các nồng độ muối từ 2% đến 7% và nồng độ muối càng cao thì mật độ các vi sinh vật càng giảm, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B5 có khả năng chịu mặn tốt nhất so với 3 chủng vi khuẩn còn lại.

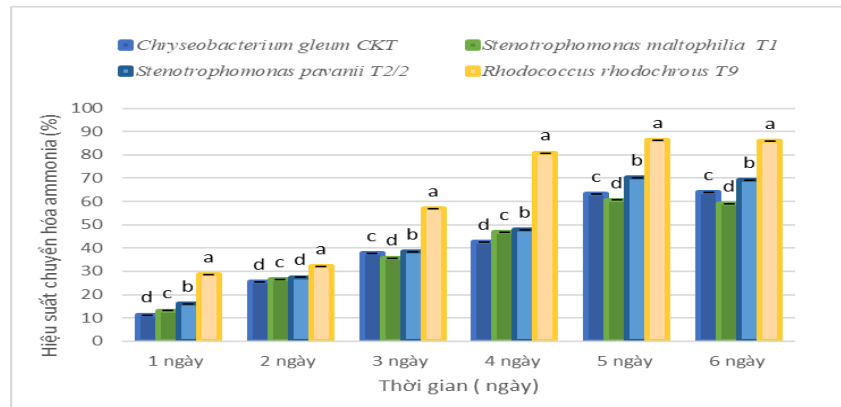
Tác giả Rajakumar (2008) đã nghiên cứu hiệu quả giảm nitrate 99,4% của nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp. và *Pseudomonas* sp. trong nước thải giàu nitrate ở nhiệt độ 30°C, pH 7. Tác giả Trịnh Hoài Vũ (2014) phân lập được 3 chủng vi khuẩn *P. stutzeri* có khả năng xử lý  $\text{NH}_4^+$  với hiệu suất 77,4% - 86,75%,  $\text{NO}_2^-$  có hiệu suất 90,36 - 98,79 %,  $\text{NO}_3^-$  có hiệu suất là 61,01% - 81,17% với thời gian là 96 giờ trong ao nuôi cá tra. Abdollahi-Arpanahi và ctv (2018) đã nghiên cứu hiệu quả của chế phẩm đã nghiên cứu hiệu quả của chế phẩm sinh học *Bacillus subtilis* và *Bacillus licheniformis* về năng suất tăng trưởng, sinh lý học miễn dịch và phản ứng đề kháng của tôm thẻ chân trắng con (*Litopenaeus vannamei*) và kết luận rằng tôm được nuôi bằng men vi sinh cho thấy khả năng chống chịu với môi trường cao. Nhóm tác giả Hastuti (2019) đã định danh 3 chủng vi sinh vật chuyển hóa nitrite là *Pantoea calida*, *Pseudomonas stutzerii* và *Halomonas* sp. từ nước nuôi cua. Kết quả nghiên cứu khá phù hợp với các nghiên cứu hiện nay trong và ngoài nước.

Từ các kết quả trên, với tiêu chí là chọn chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa các hợp chất ammonia, nitrite, nitrate trên 80%, đã chọn chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 chuyển hóa ammonia trên 95% trong 24 giờ, chuyển hóa nitrite 96,97%, chuyển hóa nitrate 89,63% trong 4 ngày và chủng vi khuẩn thứ 2 là *Pseudomonas stutzeri* KL15, có hiệu suất chuyển hóa ammonia 83,87% trong 7 ngày, chuyển hóa nitrite 99,06% trong 4 ngày, nitrate 98,02 % trong 4 ngày để tiến hành thí nghiệm cho nội dung tiếp theo.

### **3.1.5.2. Khảo sát khả năng chuyển hóa $\text{NH}_4^+$ và $\text{NO}_3^-$ và khả năng chịu mặn của nhóm vi khuẩn NOB.**

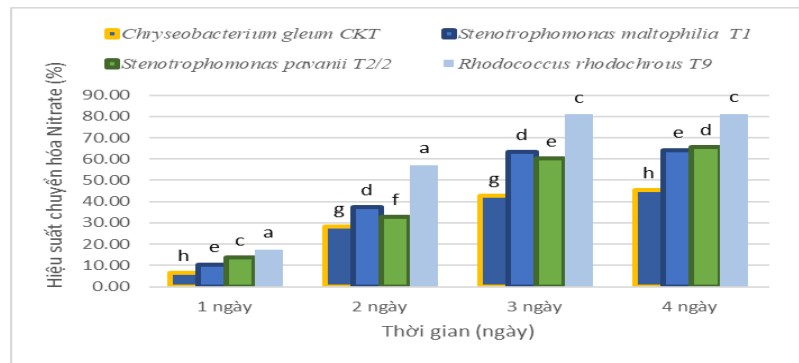
Từ 11 chủng vi khuẩn NOB chuyển hóa nitrite trên 95%, kết quả định tính (phụ lục 1.6 - bảng 1.12) cho thấy có 4 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa cả  $\text{NH}_4^+$  và  $\text{NO}_3^-$ , đó là các chủng vi khuẩn *Chryseobacterium gleum* CKT, *Stenotrophomonas maltophilia* T<sub>1</sub>, *Stenotrophomonas pavanii* T<sub>2/2</sub>, *Rhodococcus*

*rhodochrous* T<sub>9</sub>. Do đó, 4 chủng vi khuẩn trên được chọn tiến hành định lượng hàm lượng ammonia và nitrate để xác định hiệu suất xử lý.



**Hình 3.10.** Hiệu suất chuyển hóa NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của 4 chủng vi khuẩn

Hình 3.10 cho thấy hiệu suất chuyển hóa ammonia của 4 chủng vi khuẩn của các nhóm vi khuẩn tăng từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5. Đến ngày thứ 5, hiệu suất chuyển hóa ammonia của vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> tăng lên 86,21%, ngày thứ 6 thì hiệu suất chuyển hóa không tăng mà có dấu hiệu giảm nhẹ và không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Còn hiệu suất chuyển hóa ammonia của 3 chủng vi khuẩn còn lại đến ngày thứ 5 là 60%, qua ngày thứ 6 sự chuyển hóa ammonia không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với ngày thứ 5.

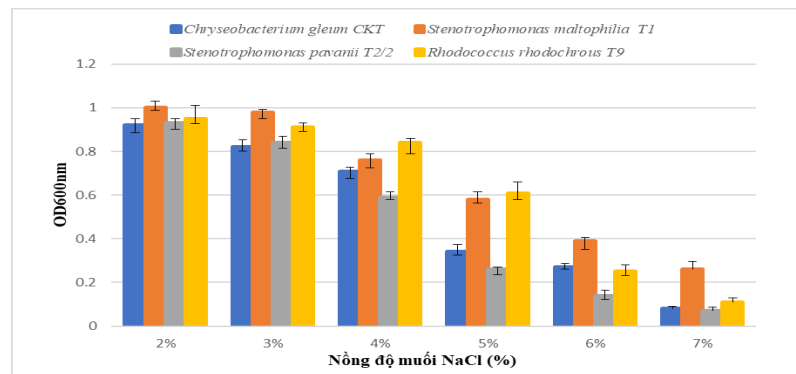


**Hình 3.11.** Hiệu suất chuyển hóa NO<sub>3</sub><sup>-</sup> của 4 chủng vi khuẩn

Hình 3.11 cho thấy hiệu suất chuyển hóa nitrate của 4 chủng vi khuẩn tăng từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 3, ngày thứ tư hiệu suất chuyển hóa nitrate không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với ngày thứ 3. Sau 4 ngày, chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> có hiệu suất chuyển hóa nitrate là 81,24% và hai chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* T<sub>1</sub>, *Stenotrophomonas pavanii* T<sub>2</sub>/2 đều có hiệu suất chuyển hóa dưới 65%. Riêng chủng vi khuẩn *Chryseobacterium*

*gleum* CKT có hiệu suất chuyển hóa nitrate dưới 50% sau 4 ngày.

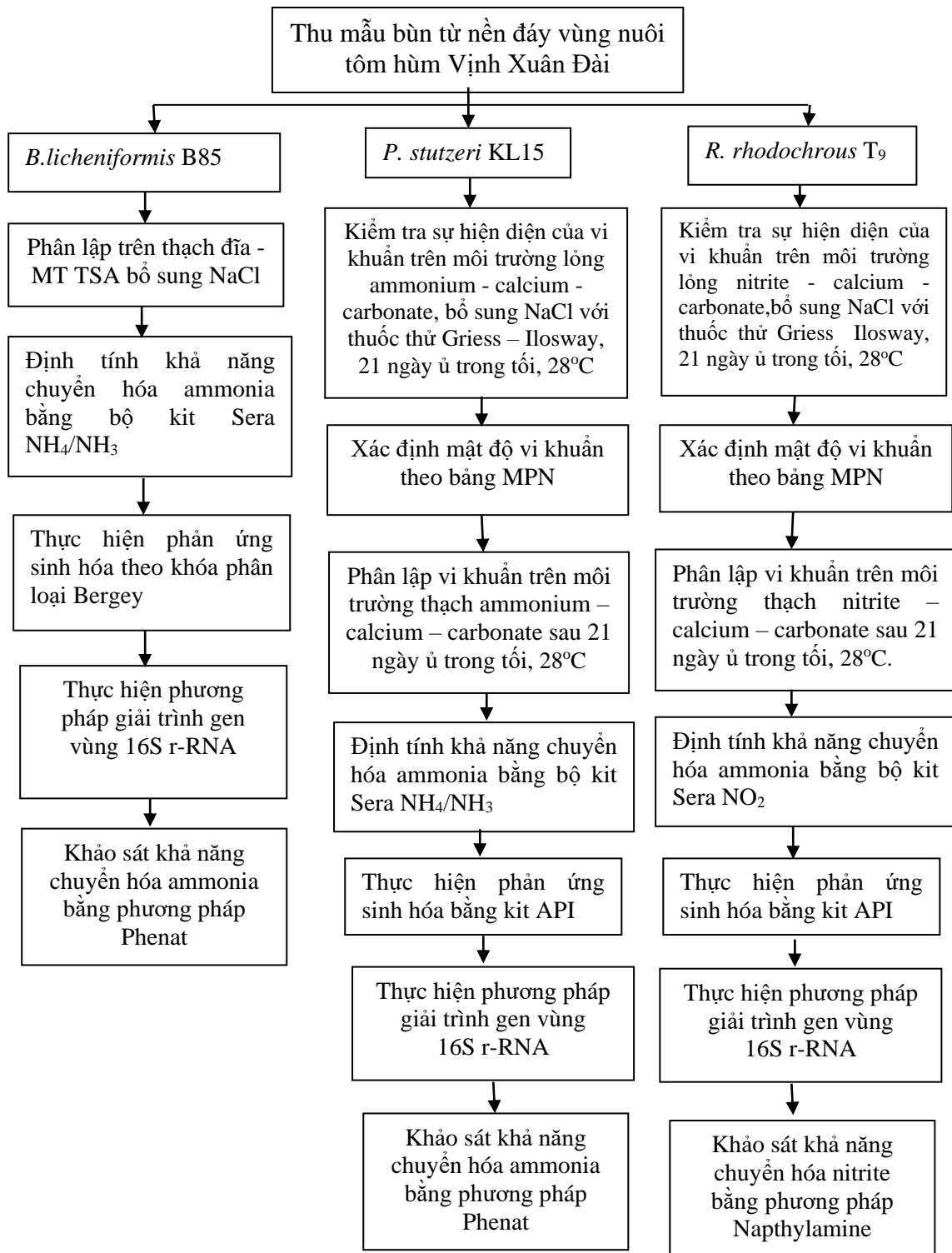
Kết quả nghiên cứu tương tự của tác giả Chen và ctv (2012) chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. chuyển đổi 85% ammonia thành nitrite, nitrate và khử nitơ trong 25 giờ, chứng tỏ chủng vi khuẩn thực hiện đồng thời quá trình nitrate hóa, khử nitơ trong xử lý nước. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của Li (2013) cũng cho thấy *Rhodococcus* sp. có khả năng sử dụng ammonia và nitrate như nguồn nitơ khi được nuôi cấy trong môi trường tăng sinh.



**Hình 3.12.** Khả năng sống ở các nồng độ NaCl của 4 chủng vi khuẩn

Hình 3.12 (phụ lục 1.6 bảng -1.17) cho thấy 4 chủng vi khuẩn đều có khả năng sống ở các nồng độ muối từ 2% - 7%, nồng độ muối càng cao thì mật độ các vi sinh vật càng giảm, vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* T<sub>1</sub> phát triển tốt nhất so với 3 chủng vi khuẩn lại. Tuy nhiên với mục tiêu là chọn lọc nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia, nitrate trên 80% trong thời gian 3-5 ngày để tiến hành tiếp tục cho nội dung 2, từ các kết quả trên, chỉ chọn được 1 chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> có chuyển hóa ammonia trên 86,21 % trong thời gian 5 ngày, chuyển hóa nitrite 95,01 % trong 3 ngày, chuyển hóa nitrate 81,24 % trong 4 ngày để tiến hành thí nghiệm cho nội dung tiếp theo.

Tóm lại, qui trình phân lập, định danh và tuyển chọn được ba chủng vi khuẩn từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm là vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> có khả năng chuyển hóa ammonia, nitrite và nitrate tốt nhất được thực hiện như hình 3.13.



**Hình 3.13.** Quy trình phân lập 3 chủng vi khuẩn ở nền đáy vùng nuôi tôm hùm

### 3.2. Nội dung 2: Tạo chế phẩm vi sinh dạng lỏng và bột

#### 3.2.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng nuôi cấy và tối ưu hóa thành phần môi trường lên men tạo chế phẩm dạng lỏng của các chủng vi khuẩn

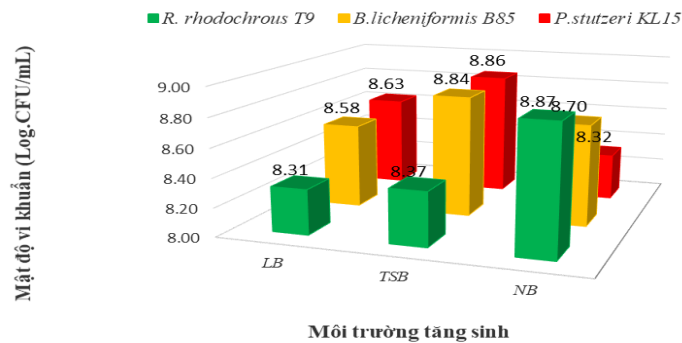
##### 3.2.1.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng sinh khối ba chủng vi khuẩn



Các chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> được khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối của vi sinh vật.

#### **Khảo sát môi trường nhân sinh khối của các chủng vi khuẩn**

Các chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> được nhân giống trên 3 môi trường lỏng giàu dinh dưỡng là NB, LB và TSB ở nhiệt độ 37°C, tỷ lệ giống 1% với mật độ 10<sup>7</sup> CFU/mL.



**Hình 3.14.** Ảnh hưởng của môi trường nhân sinh khối đến ba chủng vi khuẩn

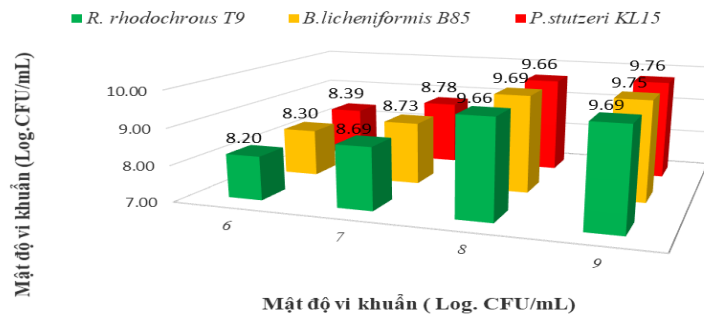
Trên hình 3.14, chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> phát triển tốt trên môi trường NB so với hai môi trường LB và TSB, mật độ đạt cao nhất trên môi trường NB là 8,87 log.CFU/mL (7,5 x 10<sup>8</sup> CFU/mL). Hai chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 đều phát triển tốt trên môi trường TSB, với mật độ vi khuẩn lần lượt là 8,84 log.CFU/mL và 8,86 log.CFU/mL (6,9 x 10<sup>8</sup> CFU/mL và 7,2 x 10<sup>8</sup> CFU/mL). Qua xử lý thống kê, đối với từng chủng vi khuẩn, các môi trường được lựa chọn có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với 2 môi trường còn lại (phụ lục 2.5.1 – bảng 2.2).

Do đó, chọn môi trường NB để nhân sinh khối vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>, môi trường TSB để nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15.

#### **Khảo sát ảnh hưởng mật độ đến nhân sinh khối các chủng vi khuẩn**

Từ kết quả thí nghiệm khảo sát môi trường nhân sinh khối, tiếp tục nuôi vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> trên môi trường NB, vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 trên môi trường TSB với thời gian

24 giờ, nhiệt độ 37°C, tỷ lệ giống là 1% với mật độ thay đổi từ  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  CFU/mL.

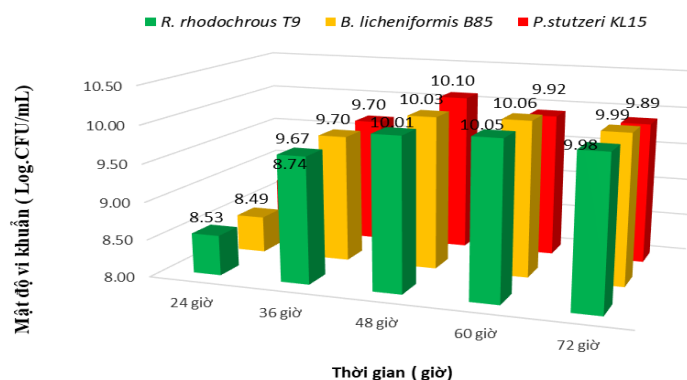


**Hình 3.15.** Ảnh hưởng của mật độ giống đến nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn

Hình 3.15 cho thấy mật độ nhân giống của vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>, *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 có mật độ giống ban đầu  $10^8$ ,  $10^9$  CFU/mL là cao nhất, đạt 4,5 - 6 x  $10^9$  CFU/mL và qua xử lý thống kê cho thấy mật độ của 3 chủng vi khuẩn ở mật độ giống  $10^8$ ,  $10^9$  CFU/mL không có sự khác biệt về mặt thống kê với nhau nhưng có sự khác biệt đối với mật độ  $10^6$ ,  $10^7$  CFU/mL ( $P < 0,01$ ) (phụ lục 2.5.1 – bảng 2.3). Do đó, để việc nhân sinh khối mang tính hiệu quả kinh tế thì chọn mật độ vi khuẩn đầu vào là  $10^8$  CFU/mL cho cả 3 chủng vi khuẩn.

#### **Khảo sát ảnh hưởng thời gian đến nhân sinh khối các chủng vi khuẩn**

Nhân giống vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> trên môi trường NB, vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 trên môi trường TSB với nhiệt độ 37°C, tỷ lệ giống là 1% với mật độ vi khuẩn ban đầu  $10^8$  CFU/mL, khảo sát thời gian tăng sinh vi khuẩn theo các mốc thời gian 24, 36, 48, 60, 72 giờ.



**Hình 3.16.** Ảnh hưởng thời gian tăng sinh đến nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn

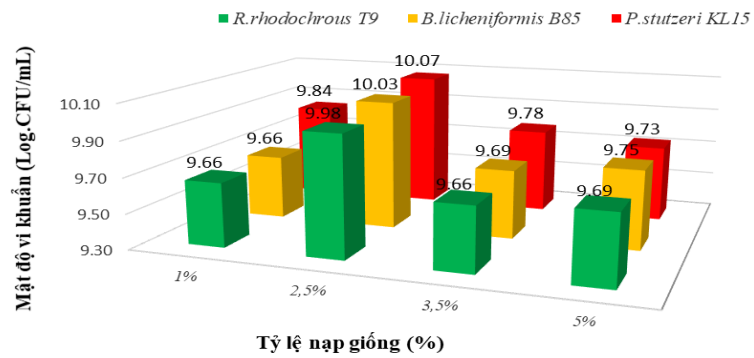
Hình 3.16 cho thấy mật độ của vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>, *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 với thời gian tăng sinh là 24, 36 giờ là gần như nhau, dao động khoảng  $9,67 \times 10^9$  -  $9,78 \times 10^9$  CFU/mL và cao hơn so với các thời gian 12, 48, 60 giờ. Xét về thống kê, thời gian tăng sinh giữa các mốc thời gian 24, 36 giờ không có sự khác biệt có ý nghĩa nhưng có sự khác biệt có ý nghĩa với mốc thời gian 12, 48, 60 giờ (phụ lục 2.5.1 – bảng 2.4). Mặc dù mật độ vi khuẩn của 3 chủng vi khuẩn ở thời gian 36 giờ cao hơn 24 giờ, tuy nhiên, để việc nhân sinh khối nhanh và có hiệu quả kinh tế, chọn mốc thời gian tăng sinh là 24 giờ cho vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub> ( $9,67 \times 10^9$  CFU/mL), *B. licheniformis* B85 ( $9,7 \times 10^9$  CFU/mL), *P. stutzeri* KL15 ( $9,7 \times 10^9$  CFU/mL).

Tóm lại, chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> được tăng sinh trên môi trường NB, thời gian 24 giờ, tỷ lệ giống 1% với mật độ  $10^8$  CFU/mL. Chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 được tăng sinh trên môi trường TSB thời gian 24 giờ, tỷ lệ giống 1% với mật độ  $10^8$  CFU/mL.

### **3.2.1.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo chế phẩm dạng lỏng** ***Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nạp giống đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn***

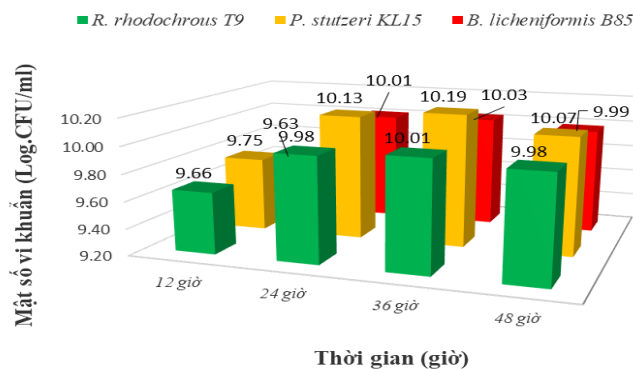
Sau khi có kết quả các điều kiện trong môi trường nhân giống ở mục 3.2.1.1, tiến hành nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>, *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 trên môi trường sản xuất (phụ lục 2.3) với thời gian 24 giờ, mật độ  $10^8$  CFU/mL với tỉ lệ nạp giống lần lượt là 1%, 2,5%, 3,5% và 5%.

Hình 3.17 cho thấy mật độ vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> là  $9,5 \times 10^9$  CFU/mL ( $9,98 \text{ Log.CFU/mL}$ ), *B.licheniformis* B85 là  $10^{10}$  CFU/mL ( $10,03 \text{ Log.CFU/mL}$ ), *P. stutzeri* KL15 là  $1,19 \times 10^{10}$  CFU/mL ( $10,07 \text{ Log.CFU/mL}$ ) khi nuôi cấy với tỉ lệ nạp giống 2,5% có sự khác biệt có ý nghĩa với các tỉ lệ nạp giống còn lại (phụ lục 2.5.2 – bảng 2.5). Do đó chọn tỉ lệ nạp giống 2,5% cho cả 3 chủng vi khuẩn ở các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 3.17.** Ảnh hưởng của tỷ lệ nạp giống đến sinh khối ba chủng vi khuẩn  
*Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn*

Nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub>, *B. licheniformis* B85, *P. stutzeri* KL15 trên môi trường sản xuất có tỉ lệ nạp giống 2,5% (mật độ  $10^8$ CFU/mL), nhiệt độ 30°C, thời gian thay đổi từ 12, 24, 36, 48 giờ .

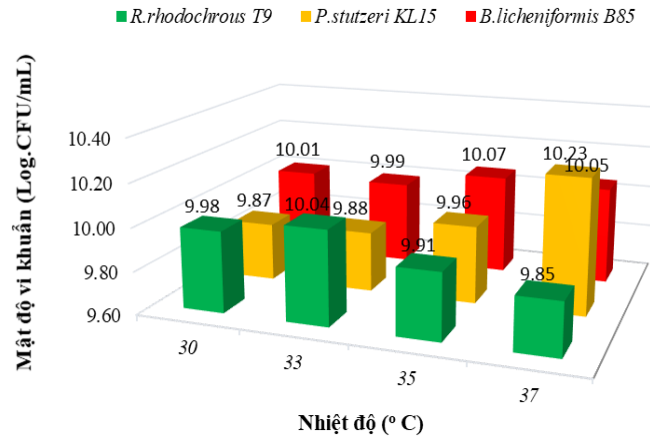


**Hình 3.18.** Ảnh hưởng của thời gian đến sinh khối ba chủng vi khuẩn

Hình 3.18 cho thấy mật độ vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub> là  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,01 Log.CFU/mL), *B. licheniformis* B85 là  $1,1 \times 10^{10}$ CFU/mL (10,03 Log.CFU/mL), *P. stutzeri* KL15 đạt giá trị cao nhất là  $1,64 \times 10^{10}$ CFU/mL (10,19 Log.CFU/mL). Sau khi xử lý thống kê (phụ lục 2.5.2 – bảng 2.6), kết quả cho thấy mật độ của ba chủng vi khuẩn nuôi cấy trong thời gian 24, 36, 48 giờ không có sự khác biệt có ý nghĩa, tuy nhiên có sự khác biệt với thời gian là 12 giờ. Trên đồ thị, mốc thời gian 36 giờ có mật độ vi khuẩn cao nhất, do đó chọn thời điểm 36 giờ cho việc nhân sinh khối vi khuẩn cả 3 chủng vi khuẩn.

### **Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn**

Nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>, *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 trên môi trường sản xuất, tỷ lệ giống 2,5% (mật độ 10<sup>8</sup>CFU/mL), thời gian 36 giờ với nhiệt độ thay đổi lần lượt là 30°C, 33°C, 35°C và 37°C.



**Hình 3.19.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh khối ba chủng vi khuẩn

Hình 3.19 cho thấy mật độ vi khuẩn *B.licheniformis* B85 là  $1,2 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,07 Log.CFU/mL) ở 35° C, *P.stutzeri* KL15 đạt giá trị cao nhất là  $1,75 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,23 Log.CFU/mL) khi nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> là đạt cao nhất ở 33°C với mật độ là  $1,1 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,04 Log.CFU/mL) (phụ lục 2.5.2 – bảng 2.7).

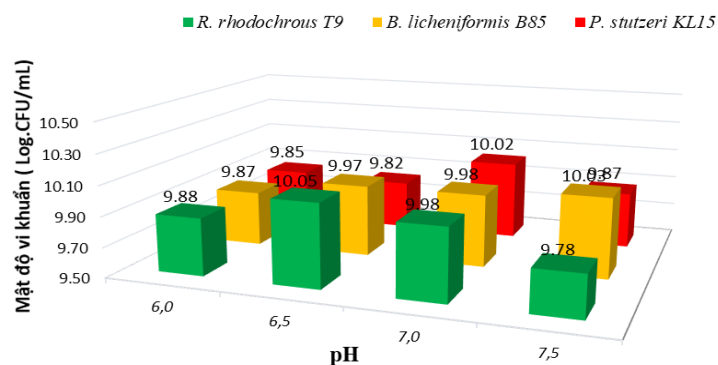
Vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 ở mức nhiệt độ 35° C lại có sự khác biệt có ý nghĩa với 33°C, không có ý nghĩa thống kê với 30 °C, 37 °C, do đó để việc sản xuất có hiệu quả kinh tế, chọn nhiệt độ 30 °C cho thí nghiệm tiếp theo. Đối với vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 khi nuôi cấy vi khuẩn ở nhiệt độ từ 30 °C đến 37 °C, mật độ vi khuẩn tăng dần. Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn khi nuôi cấy ở 37 °C không có khác biệt có ý nghĩa so với các nhiệt độ 30, 33, 35° C do  $p > 0,05$ . Mật độ vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> ở mức nhiệt độ 33°C có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê với 35°C, 37°C nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa với 30°C, tuy nhiên xét về hiệu quả kinh tế thì chọn mức 30° C cho thí nghiệm tiếp theo.

Do đó, nhiệt độ nhân sinh khối vi khuẩn là 30°C được lựa chọn cho các thí

nghiệm tiếp theo nhằm giảm chi phí cho quá trình lên men nhân sinh khối *Pseudomonas stutzeri* KL15. Trong thí nghiệm lựa chọn nhiệt độ, ba chủng vi khuẩn đều được tăng sinh ở nhiệt độ phòng (30 °C).

### **Khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn**

Nhân sinh khối ba chủng vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub>, *B.licheniformis* B85, *P. stutzeri* KL15 trên môi trường sản xuất, tỷ lệ giống 2,5% (mật độ 10<sup>8</sup>CFU/mL), thời gian 36 giờ, nhiệt độ 30°C, pH thay đổi theo các mức như sau: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5.

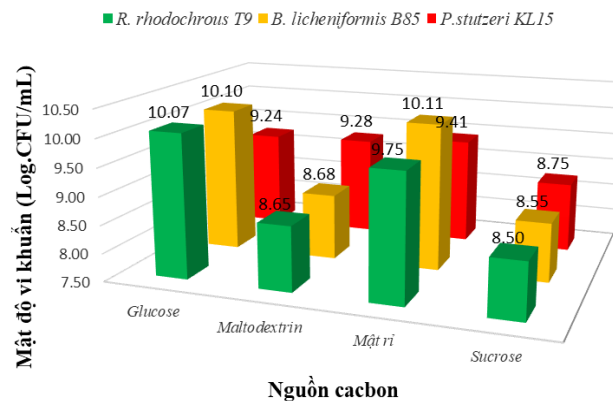


**Hình 3.20.** Ảnh hưởng của pH đến sinh khối ba chủng vi khuẩn

Hình 3.20 cho thấy mật độ vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> là đạt cao nhất ở pH 6,5 với mật độ là 1,13 x 10<sup>10</sup> CFU/mL (10,05 Log.CFU/mL), *B. licheniformis* B85 là 1,1 x 10<sup>10</sup> CFU/mL (10,03 Log.CFU/mL) ở pH 7,5. *P.stutzeri* KL15 đạt giá trị cao nhất là 1,1 x 10<sup>10</sup>CFU/mL(10,02 Log.CFU/mL) khi nuôi cấy ở pH 7. Sau khi xử lý thống kê (phụ lục 2.5.2 – bảng 2.8), vi khuẩn *B.licheniformis* B85 ở mức pH 7,5 không có ý nghĩa thống kê với pH 6,5, 7,0, nhưng khác biệt có ý nghĩa với pH 6, do đó để việc sản xuất có hiệu quả kinh tế, chọn pH 7 cho thí nghiệm tiếp theo. Đối với vi khuẩn *P.stutzeri* KL15 ở mức pH 7 khác biệt có ý nghĩa với các mức pH còn lại, chọn pH 7 để nhân sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL1. Mật độ vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> ở mức pH 6,5 không có sự khác biệt có ý nghĩa với pH 7, khác biệt có ý nghĩa với mức pH 6 và 7,5. Tuy nhiên để việc lên men nhanh, tiết kiệm được chi phí, chọn pH 7 cho việc lên men chủng vi khuẩn này. Do đó, pH 7 được lựa chọn để lên men nhân sinh khối cả 3 chủng vi khuẩn các thí nghiệm sau.

### Khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon

Ba chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>, *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15 được tăng sinh trong môi trường sản xuất, tỷ lệ giống 2,5% (mật độ  $10^8$ CFU/mL), nhiệt độ 30°C, thời gian 36 giờ và pH7. Môi trường sản xuất vi sinh ban đầu có nguồn cacbon được sử dụng là glucose 10g/L, được thay thế bằng mật rỉ, maltosedextrine, sucrose với 10g/L.



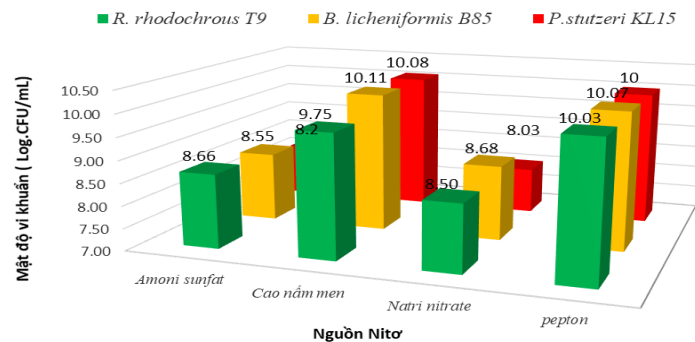
**Hình 3.21.** Ảnh hưởng của Cacbon đến sinh khối ba chủng vi khuẩn

Hình 3.21 (phụ lục 2.5.2 – bảng 2.9) cho thấy mật độ chủng vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> cao nhất  $1,27 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,10 Log.CFU/mL) ở nguồn cacbon là glucose, kể đến là mật rỉ đường là  $5,6 \times 10^9$  CFU/mL (9,75 Log.CFU/mL), tuy nhiên theo kết quả thống kê thì glucose có sự khác biệt ý nghĩa với các nguồn cacbon còn lại, do đó chọn glucose để lên men vi khuẩn.

Với nguồn cacbon là mật rỉ đường thì mật độ vi khuẩn *B. licheniformis* B85 cao nhất  $1,3 \times 10^{10}$  CFU/mL, kể đến là nguồn cacbon là glucose  $1,25 \times 10^{10}$ CFU/mL.Tương tự, chủng vi khuẩn *P.stutzeri* KL15 cao nhất với nguồn cacbon là mật rỉ đường đạt  $2,56 \times 10^9$  CFU/mL, sau đó đến glucose và maltodextrin. Xét về thống kê, giữa hai nguồn cacbon là mật rỉ đường và glucose của hai chủng vi khuẩn không có sự khác biệt có ý nghĩa nhưng xét về giá trị kinh tế, mật rỉ đường là nguồn cacbon rẻ tiền hơn glucose, rất thích hợp cho quá trình lên men thu nhận sinh khối vi khuẩn. Do đó, chọn nguồn cacbon là mật rỉ đường cho 2 chủng vi khuẩn *B. licheniformis* B85, *P.stutzeri* KL15, chọn glucose cho vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> để tiếp tục thí nghiệm tiếp theo.

### Khảo sát ảnh hưởng của nguồn Nitơ

Sau khi chọn được nguồn cacbon cho 3 chủng vi khuẩn, môi trường sản xuất vi sinh ban đầu có nguồn nitơ là pepton 10g/L được thay thế bằng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  và cao nấm men với nồng độ 10 g/L. Hình 3.22 (phụ lục 2.5.2 – bảng 2.10) cho thấy thành phần nitơ là cao nấm men cho giá trị mật độ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 cao nhất  $1,28 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,11 Log.CFU/mL), kế đến là pepton ( $1,17 \times 10^{10}$  CFU/mL tương ứng là 10,07 Log.CFU/mL), giữa hai nguồn nitơ này không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê, tuy nhiên xét về mật độ vi khuẩn thì cao nấm men cho kết quả cao hơn.



**Hình 3.22.** Ảnh hưởng của Nitơ đến sinh khối ba chủng vi khuẩn

Trong các nguồn nitơ được khảo sát, cao nấm men có ảnh hưởng lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15, đạt giá trị  $1,31 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,08 Log.CFU/mL). Nguồn nitơ hữu cơ khác là peptone cho giá trị mật độ vi khuẩn thấp hơn, khoảng 7% so với nguồn cao nấm men. Trong khi đó, các nguồn nitơ vô cơ như  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{NaNO}_3$  không thích hợp cho quá trình sinh trưởng của vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15. Mật độ chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> cao nhất  $1,08 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,03 Log.CFU/mL) ở nguồn nitơ là pepton 10g/L, có sự khác biệt có ý nghĩa so với các nguồn nitơ còn lại. Vậy, chọn nguồn nitơ là cao nấm men cho 2 chủng vi khuẩn *B. licheniformis* B85, *P. stutzeri* KL15, pepton là nguồn nitơ cho vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub> để tiếp tục thí nghiệm tối ưu hóa môi trường sản xuất vi khuẩn.

Tóm lại, 3 chủng vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub>, *B. licheniformis* B85, *P. stutzeri*



KL15 được nuôi cấy với tỷ lệ giống 2,5% (mật độ  $10^8$ CFU/mL), nhiệt độ 30°C, thời gian 36 giờ và pH 7. Nguồn nitơ và cacbon trong môi trường sản xuất cho 2 chủng vi khuẩn *B.licheniformis* B85, *P.stutzeri* KL15 là mật rỉ đường và cao nấm men, chủng vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub> thì glucose và pepton. Phương Thị Hương và Vũ Văn Hạnh (2017) khảo sát tỷ pH 7, 37° C, sử dụng 7% giống, với nguồn carbon chính là glucose (1,5%), nguồn nitơ chính là peptone (1%), bổ sung 50 mM ion  $Ca^{2+}$  thì sau 24 giờ lên men chủng vi khuẩn *B. subtilis* BSVN15 đạt được mật độ  $6,33 \times 10^{11}$  CFU/ml. Kết quả nghiên cứu tạo chế phẩm vi khuẩn *Bacillus* trong nghiên cứu này thấp hơn của nghiên cứu tham khảo, do đó để tăng mật số cần tiến hành tối ưu hóa môi trường. Tác giả Vương Thị Nga (2014), khảo sát tạo chế phẩm vi khuẩn *Rhodococcus ruber* TD2 đã được phân lập tại vùng ven biển Việt Nam, ứng dụng trong tạo chất hoạt hóa bề mặt sinh học. Nguyễn Thị Ngọc Sương (2016), tạo chế phẩm vi khuẩn *Pseudomonas* có khả năng hòa tan lân. Đây là nội dung trung gian cho tối ưu hóa môi trường tạo sinh khối cho 3 dòng vi khuẩn, do đó tài liệu tham khảo về các yếu tố ảnh hưởng đến sản xuất chế phẩm vi sinh khá hạn chế.

### **3.2.1.3. Tối ưu hóa các thành phần môi trường nhân sinh khối của 3 chủng vi khuẩn bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RMS).**

#### ***Tối ưu hóa thành phần môi trường sản xuất sinh khối vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85***

- *Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng ma trận Plackett – Burman*

Dịch tăng sinh vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 với các điều kiện khảo sát từ các thí nghiệm trên môi trường sản xuất, sau khi điều chỉnh đạt mật độ vi khuẩn  $10^8$  CFU/mL được cấy vào môi trường gồm 6 thành phần là mật rỉ đường, cao nấm men,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$  và NaCl đã được bố trí theo ma trận Plackett – Burman, các biến ở các mức cao và thấp thì giữa giá trị mô hình và thực nghiệm có sự chênh lệch không đáng kể, có 3 nghiệm thức có giá trị dự đoán của mô hình với thực nghiệm giống nhau ( phụ lục 2.5.3 – bảng 2.12).

Sau khi xử lý thu được như sau: từ 6 yếu tố chọn được 3 yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$ ), bao gồm: mật rỉ đường có mức ảnh hưởng dương, cao nấm men và NaCl

là mức ảnh hưởng âm. Trong khi đó 3 yếu tố gồm  $K_2HPO_4$ ,  $CaCl_2$  và  $MgSO_4$  có ảnh hưởng thấp, đồng thời giá trị  $p > 0,05$  nên không có ý nghĩa về mặt thống kê, do đó bị loại bỏ. Dựa vào mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy cho thấy NaCl có tác động lớn nhất đến mật độ vi khuẩn (0,063), kế đến là cao nấm men (0,06) và cuối cùng là mật rỉ đường (0,043) (phụ lục 2.5.3 – bảng 2.11). Do đó chọn ba yếu tố mật rỉ đường, cao nấm men và NaCl cho thiết kế thí nghiệm theo ma trận Box – Behnken để xác định sự tương tác giữa các yếu tố cũng như xác định các thông số tối ưu ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85.

- *Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn*

Từ ba yếu tố đã được sàng lọc bằng ma trận Plackett - Burman bao gồm mật rỉ đường, cao nấm men và NaCl, tiến hành thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa. Dịch tăng sinh vi khuẩn sau khi làm theo các điều kiện đã khảo sát sẽ được cấy vào môi trường có thành phần được bố trí theo ma trận Box – Behnken, điều kiện lên men sản xuất sinh khối theo điều kiện nhiệt độ 30°C, thời gian 36 giờ, tỷ lệ giống 2,5% với mật độ mật độ  $10^8$  CFU/mL và pH 7.

**Bảng 3.11.** Thiết kế ma trận Box - Behnken

Thí nghiệm	Mật rỉ đường (A)	Cao nấm men (B)	NaCl (C')	Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/mL)	
				Thực nghiệm	Mô hình
1	1	1	0	11,25	11,24
2	0	1	-1	11,21	11,22
3	1	0	1	11,36	11,36
4	0	-1	1	11,18	11,17
5	1	-1	0	11,22	11,23
6	-1	0	-1	11,39	11,38
7	0	0	0	11,41	11,42
8	0	-1	-1	11,35	11,34
9	0	0	0	11,43	11,42
10	0	1	1	11,21	11,22
11	-1	-1	0	11,19	11,20
12	0	0	0	11,42	11,42
13	-1	0	-1	11,36	11,38
14	1	0	-1	11,37	11,37
15	-1	1	0	11,12	11,11

Bảng 3.11 cho thấy mật độ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 trong thực nghiệm nằm trong khoảng từ 11,12 Log.CFU/mL đến 11,43 Log.CFU/mL. Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất khi nồng độ thành phần môi trường như sau: mật rỉ đường 4 g/L, cao nấm men 17 g/L và NaCl 3 g/L. Trong khi đó khi nồng độ các thành phần môi trường gồm mật rỉ đường 2 g/L, cao nấm men 25 g/L và NaCl 3 g/L thì mật độ vi khuẩn đạt thấp nhất. Trong mô hình dự đoán kết quả, thì kết quả cho tương tự như giá trị thực nghiệm.

**Bảng 3.12.** Kết quả phân tích ANOVA của thí nghiệm Box - Behnken

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	F-value	p-value	
<b>Model</b>	0,1487	9	0,0165	64,01	0,0001	Có ý nghĩa
A – Mật rỉ đường	0,0083	1	0,0083	32,27	0,0024	
B – Cao nấm men	0,0028	1	0,0028	10,89	0,0215	
C' – NaCl	0,0108	1	0,0108	41,85	0,0013	
AB	0,0025	1	0,0025	9,68	0,0265	
AC'	0,0035	1	0,0035	13,59	0,0142	
BC'	0,0072	1	0,0072	27,98	0,0032	
A <sup>2</sup>	0,0140	1	0,0140	54,11	0,0007	
B <sup>2</sup>	0,0766	1	0,0766	296,81	< 0,0001	
C' <sup>2</sup>	0,0019	1	0,0019	7,36	0,0422	
<b>Phần dư</b>	0,0013	5	0,0003			
Sự thiếu phù hợp	0,0006	2	0,0003	1,48	0,3572	Không có ý nghĩa
Sai số	0,0007	3	0,0002			
<b>Tổng</b>	0,1500	14	11,30			
R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Pre</sub> <sub>d</sub>	CV%	Adeq		
0,9914	0,9759	0,9203	0,1422	precision 23,4233		

Từ kết quả phân tích ANOVA ở Bảng 3.12 ảnh hưởng của 3 yếu tố đến hàm

mục tiêu. Các giá trị của các nhân tố tuyến tính (A, B, C') và giá trị bậc hai ( $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C'^2$ ), ba tương tác AB, AC' và BC' đều thể hiện mức độ ý nghĩa tin cậy cao (p-value < 0,05) khi tham gia mô hình. Giá trị p-value là 0,0001 đã chứng tỏ mô hình thí nghiệm được thiết lập có ý nghĩa thống kê cao. Hệ số xác định tương quan  $R^2$  là yếu tố xác định sự phù hợp của mô hình được kiểm chứng. Khi hệ số xác định tương quan  $R^2$  lớn hơn 0,8 thì mô hình có độ tương quan tốt (Guan và Yao, 2008).

Mô hình tương quan được xây dựng từ thí nghiệm phải thoả mãn điều kiện với giá trị  $R^2$  cao ( $R^2 = 0,9914$ ) tức có 99,14 % số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu mô hình. Điều này cũng chứng tỏ rằng mô hình phù hợp với các đại diện đầy đủ của các mối quan hệ thực sự giữa các biến được lựa chọn. Theo Montgomery (1984), giá trị p-value của Lack of Fit (sự thiếu phù hợp) là 0,3572 ( $p > 0,05$ ) không có ý nghĩa, cho thấy sự tương thích của mô hình với thực nghiệm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy giá trị bình phương của cao nấm men (p-value < 0,0001) và mật rỉ đường (p-value = 0,0007), NaCl (p-value = 0,0422), sự tương tác giữa hai yếu tố mật rỉ đường và cao nấm men (AB, p-value = 0,0265), sự tương tác giữa cao nấm men và NaCl (BC', p-value = 0,0032), tương tác giữa mật rỉ đường và NaCl (AC', p-value = 0,0142) đều có ảnh hưởng có ý nghĩa đến mật độ vi khuẩn. Bên cạnh đó, sự thay đổi của NaCl (p-value = 0,0013) so với 2 yếu tố cao nấm men và mật rỉ đường cũng ảnh hưởng tới mật độ vi khuẩn. Hệ số xác định tương quan  $R^2 = 0,9914$  cho thấy 99,14% phương sai của mật độ khuẩn có thể được giải thích bởi ba yếu tố trên. Đồng thời,  $R^2$  hiệu chỉnh của mô hình cao ( $R^2_{Adj} = 0,9759$ ) cho thấy mô hình thể hiện thực tế khá chính xác và  $R^2$  dự đoán phù hợp với  $R^2$  hiệu chỉnh cho thấy mô hình đã đầy đủ. Adeq Precision (độ chính xác đầy đủ) = 23,4233 thể hiện một tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu tố (yêu cầu >4), điều này cho thấy mô hình phù hợp để đưa vào thực tế.

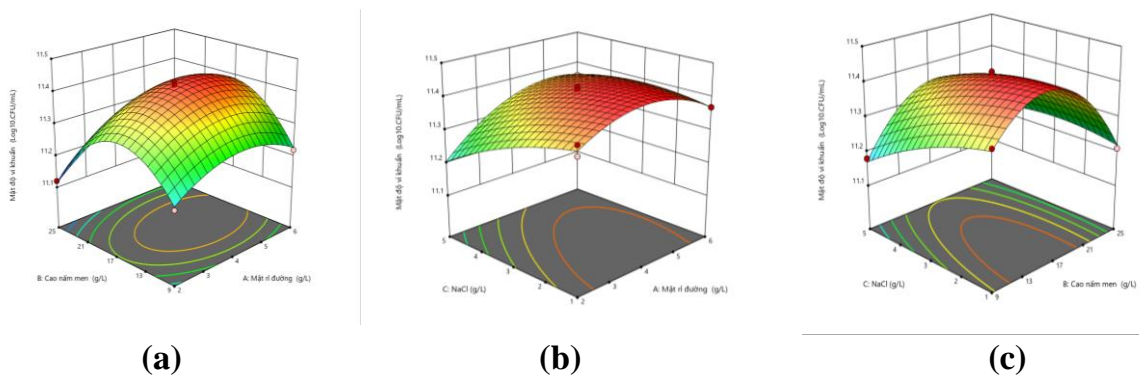
Dựa vào kết quả phân tích (phụ lục 2.5.3 – bảng 2.13), phương trình hồi quy đa biến cho kết quả trên được thể hiện như sau:

$$Y1 = 11,42 + 0,0386 A - 0,0188 B - 0,0439 C' + 0,0250 AB + 0,0404 AC' +$$

$$0,0425 BC' - 0,0673 A^2 - 0,1577 B^2 - 0,0248 C'^2$$

Trong đó: Y1 là mật độ vi khuẩn (Log.CFU/mL) A mật rỉ đường (g/L), B là cao nấm men (g/L), C' là NaCl (g/L).

Kết quả ở Hình 3.23 (b) (c) cho thấy các yếu tố NaCl là yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất đến đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn, khi yếu tố NaCl tương tác với yếu tố cao nấm men thì cho thấy cũng ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn nhiều nhất, kể đến là sự tương tác của yếu tố NaCl đến mật rỉ đường. Trong kết quả định danh sinh hóa, vi khuẩn *B. licheniformis* B85 có thể sống ở môi trường NaCl ở 6,5%, do đó có thể vi khuẩn sẽ phát triển mạnh trong môi trường chứa NaCl, kết quả đồ thị cho thấy khi tăng hàm lượng NaCl lên thì mật độ vi khuẩn tăng, vì khi NaCl ngoài tác dụng bổ sung nguồn ion Cl<sup>-</sup> vào môi trường, mà còn thay đổi sức thẩm thấu của tế bào vi khuẩn, giúp cho vi khuẩn tiết ra nhiều enzyme để sử dụng các chất hữu cơ trong môi trường, làm tăng mật độ vi khuẩn (Lương Đức Phẩm, 1998).



**Hình 3.23.** Mặt đáp ứng giữa các yếu tố. (a) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và mật rỉ đường, (b) Mặt đáp ứng tương tác giữa mật rỉ đường và NaCl (c) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và NaCl.

Hình 3.23 (a) (b), yếu tố rỉ đường cũng ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn sau yếu tố NaCl, tuy nhiên khi mật rỉ tăng lên 1 nồng độ nhất định thì sẽ giúp vi khuẩn phát triển nhanh, còn nếu tăng cao quá sẽ kiềm hãm sự phát triển của mật độ vi khuẩn (Lương Đức Phẩm, 1998).

Hình 3.23 (a) (c) cho thấy yếu tố cao nấm men là cũng có ảnh hưởng tương đối đến mật độ vi khuẩn, ít hơn hai yếu tố kia. Sreekumar và ctv (2010), tối ưu hóa điều kiện nhân sinh khối chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* SK09 với yếu tố pH

(6,72), amoni citrate (0,164%) và peptone (0,85%), cho mật số  $10,051.10^9$  CFU/mL. Kết quả của nhóm tác giả Han và ctv (2014), đã tối ưu hóa chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* STF26 trong môi trường nuôi cấy và các yếu tố ảnh hưởng, cho thấy với nồng độ dextrose là 20%, cao nấm men 1,526%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% và 0,5%  $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  ở  $30,9^\circ\text{C}$  và pH 6,9, thu sinh khối vi khuẩn 4,23 g/L cao gấp 2,5 lần khi nuôi trên môi trường TSB. Kết quả nghiên cứu của Đoàn Thị Tuyết Lê và ctv (2020) tối ưu hóa môi trường nuôi cấy của vi khuẩn *Bacillus subtilis* LH1, cho thấy hàm lượng NaCl 7,5 g/L, nguồn Nitơ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  15g/L và  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,13g/L cho mật độ vi khuẩn  $10^9$  CFU/mL. Kết quả của đề tài nghiên cứu có kết quả khá phù hợp với các nghiên cứu của hai nhóm tác giả trên vì thành phần môi trường để tối ưu vi khuẩn *Bacillus licheniformis* là cao nấm men, mật rỉ và NaCl, về hàm lượng các yếu tố khác nhau là do các chủng vi khuẩn cùng chi nhưng khác loài có thể sẽ sử dụng hàm lượng các nguồn nitơ, cacbon, khoáng khác nhau. Ngoài ra, Võ Hồng Phượng và ctv (2019), tối ưu các điều kiện lên men được sử dụng bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM), môi trường để sản xuất sinh khối *Bacillus* S5 sau 48 giờ lên men đạt giá trị  $\text{OD}_{550\text{nm}}$  11,36 tương ứng  $4,3 \times 10^9$  CFU/mL là: bột đậu nành 34,9 g/L, cao nấm men 20 g/L, glucose 35 g/L và tốc độ lắc 170 vòng/phút. Ngoài ra, 0,5 g/L ion  $\text{Ca}^{2+}$  được bổ sung sau 30 giờ lên men có thể kích thích trên 90% tế bào dinh dưỡng *Bacillus* S5 chuyển thành bào tử. Kết quả có sự khác biệt với nghiên cứu đã thực hiện, do tác giả thực hiện tối ưu hóa môi trường lên men *Bacillus* sp. ở dạng bột. Từ các dữ liệu thu được, mô hình dự đoán các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất là mật rỉ đường: 3,94 g/L, cao nấm men: 15,56 g/L và NaCl 1,13g/L, cho ra kết quả dự đoán trong phần mềm DX11 là 11,44 Log.CFU/mL ( $2,77 \times 10^{11}$  CFU/mL). Tiến hành thí nghiệm nuôi cấy vi khuẩn theo thành phần môi trường mà mô hình dự đoán, cho kết quả vi khuẩn trong thực nghiệm là  $3,14 \times 10^{11}$  CFU/mL (11,49 Log.CFU/mL) ở điều kiện nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ , 36 giờ, pH 7, tỷ lệ giống 2,5%, khá tương thích với kết quả mô hình dự đoán.

**Tối ưu hóa thành phần môi trường sản xuất sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15**

- Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng ma trận Plackett – Burman

Dịch tăng sinh vi khuẩn với các điều kiện khảo sát từ các thí nghiệm trên sau khi điều chỉnh đạt mật độ vi khuẩn  $10^8$  CFU/mL được cấy vào môi trường gồm 6 thành phần là mật rỉ đường, cao nấm men,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$  và NaCl đã được bố trí theo ma trận Plackett – Burman (phụ lục 2.5.3 – bảng 2.15).

Sau khi xử lý thu được kết quả như sau: từ 6 yếu tố chọn được 3 yếu tố có độ ảnh hưởng lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 đều là các giá trị có ảnh hưởng + với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$ ), bao gồm: mật rỉ đường, cao nấm men và  $MgSO_4$ . Trong khi đó 3 yếu tố gồm  $K_2HPO_4$ ,  $CaCl_2$  và NaCl có độ ảnh hưởng thấp đến mật độ vi khuẩn, đồng thời giá trị  $p > 0,05$  nên không có ý nghĩa về mặt thống kê, do đó bị loại bỏ. Dựa vào hệ số ảnh hưởng cho thấy mật rỉ đường có tác động lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 (0,55), sau đó là cao nấm men (0,32) và cuối cùng là  $MgSO_4$  (0,25) (phụ lục 2.5.3 – bảng 2.14). Do đó chọn ba yếu tố này cho thiết kế thí nghiệm theo ma trận Box - Behnken để xác định sự tương tác giữa các yếu tố cũng như xác định các thông số tối ưu ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *P. stutzeri* KL15.

• *Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn*

Từ ba yếu tố đã được sàng lọc bằng ma trận Plackett - Burman bao gồm mật rỉ đường, cao nấm men và  $MgSO_4$ , tiến hành thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa. Dịch tăng sinh vi khuẩn sau 24 giờ, mật độ  $10^8$  CFU/mL sẽ được cấy vào môi trường có thành phần được bố trí theo ma trận Box – Behnken (Box và Behnken, 1960; Ferreira và ctv, 2007). Xác định mật độ vi khuẩn và nhập vào phần mềm Design Expert 11 để xử lý số liệu.

**Bảng 3.13.** Thiết kế ma trận Box - Behnken

Thí nghiệm	Mật rỉ đường (A)	Cao nấm men (B)	$MgSO_4$ (C)	Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/mL)	
				Thực nghiệm	Mô hình
1	1	0	-1	11,37	11,38
2	0	0	0	11,54	11,55
3	1	1	0	11,53	11,51
4	0	-1	1	11,36	11,35
5	-1	0	-1	11,04	11,05

6	-1	0	1	11,20	11,19
7	0	-1	-1	11,28	11,25
8	0	0	0	11,54	11,55
9	0	1	-1	11,31	11,32
10	0	0	0	11,57	11,55
11	0	1	1	11,43	11,46
12	1	0	1	11,48	11,47
13	-1	1	0	11,17	11,15
14	1	-1	0	11,36	11,38
15	-1	-1	0	11,09	11,11

Kết quả từ Bảng 3.13 cho thấy mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 nằm trong khoảng từ 11,04 Log.CFU/mL đến 11,57 Log.CFU/mL. Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất khi nồng độ thành phần môi trường như sau: mật rỉ đường 4 g/L, cao nấm men 17 g/L và MgSO<sub>4</sub> 1 g/L. Trong khi đó khi nồng độ các thành phần môi trường gồm mật rỉ đường 2 g/L, cao nấm men 17 g/L và MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L thì mật độ vi khuẩn đạt thấp nhất.

Từ kết quả phân tích ANOVA ảnh hưởng của 3 yếu tố đến hàm mục tiêu được trình bày ở Bảng 3.14, các giá trị của các nhân tố tuyến tính (A, B, C) và giá trị bậc hai (A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup>) đều thể hiện mức độ ý nghĩa tin cậy cao (p-value < 0,05) khi tham gia mô hình ngoại trừ ba tương tác AB, AC và BC (p-value > 0,05). Giá trị F-value của mô hình là 54,25 và giá trị p-value = 0,0002 đã chứng tỏ mô hình thí nghiệm được thiết lập có ý nghĩa thống kê cao.

**Bảng 3.14.** Kết quả phân tích ANOVA của thí nghiệm Box - Behnken

Nguồn biến thiên	Tổng	Bậc tự do	Trung bình	F-value	p-value	
	bình phương		bình phương			
<b>Model</b>	0,3979	9	0,0442	54,25	0,0002	significant
A – Mật rỉ đường	0,1922	1	0,1922	235,83	<0,0001	
B – Cao nấm men	0,0153	1	0,0153	18,79	0,0075	
C – MgSO <sub>4</sub>	0,0276	1	0,0276	33,88	0,0021	
AB	0,002	1	0,002	2,48	0,1758	



AC	0,0006	1	0,0006	0,77	0,4213
BC	0,0004	1	0,0004	0,49	0,5148
A <sup>2</sup>	0,1036	1	0,1036	127,11	0,0001
B <sup>2</sup>	0,0333	1	0,0333	40,89	0,0014
C <sup>2</sup>	0,0447	1	0,0447	54,82	0,0007
<b>Phần dư</b>	0,0041	5	0,0008		
Sự thiếu phù hợp	0,0035	3	0,0012	3,86	0,2125
Sai số	0,0006	2	0,0003		
<b>Tổng</b>	0,402	14	0,0442		
R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Pred</sub>	C,V,%	Adeq precision	
0,9899	0,9716	0,8583	0,2515	21,6113	

Dựa vào kết quả phân tích (phụ lục 2.5.3 – bảng 2.16), phương trình hồi quy đa biến cho kết quả trên được thể hiện như sau:

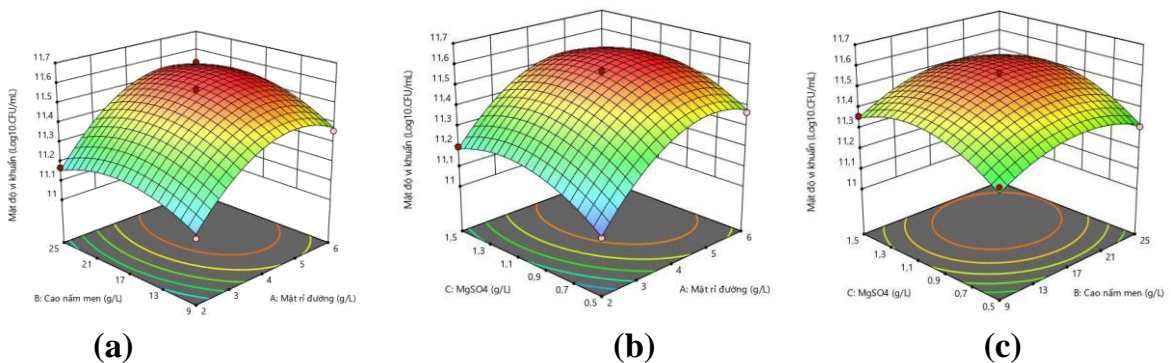
$$Y_2 = 11,55 + 0,1550A + 0,0437B + 0,0588C - 0,1675A^2 - 0,0950B^2 - 0,1100C^2.$$

Trong đó: Y<sub>2</sub> là mật độ vi khuẩn (Log. CFU/mL), A mật rỉ đường (g/L), B là cao nấm men (g/L), C là MgSO<sub>4</sub> (g/L).

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy mật rỉ đường (p-value < 0,0001), cao nấm men (p-value = 0,0075), MgSO<sub>4</sub> (p-value = 0,0021) và các giá trị bình phương của các yếu tố A, B, C đều ảnh hưởng tới mật độ vi khuẩn còn các giá trị tương tác AC, AB, BC có giá trị p-value > 0,05 nên không có ý nghĩa trong mô hình. Hệ số xác định tương quan R<sup>2</sup> = 0,9899 cho thấy 98,99% phương sai của mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 có thể được giải thích bởi các yếu tố trên. Đồng thời, R<sup>2</sup> hiệu chỉnh của mô hình cao, (R<sup>2</sup><sub>Adj</sub> = 0,9716) cho thấy mô hình thể hiện thực tế khá chính xác và R<sup>2</sup> dự đoán (R<sup>2</sup><sub>pred</sub> = 0,8583) phù hợp với R<sup>2</sup> hiệu chỉnh (sai khác phù hợp là nhỏ hơn 0,20) cho thấy mô hình đã đầy đủ. Adeq Precision (độ chính xác đầy đủ) = 21,6113 thể hiện một tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu tốt (yêu cầu >4), điều này cho thấy mô hình phù hợp để đưa vào thực tế. Để xác định mức độ tối ưu của mỗi yếu tố đối với mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 và sự tương tác của từng cặp yếu tố, đồ thị bề mặt

3D - đáp ứng bề mặt được xây dựng với trục Z là mật độ vi khuẩn *P.stutzeri* KL15 và 2 yếu tố độc lập bất kỳ, trong khi duy trì yếu tố còn lại ở mức tối ưu.

Hình 3.24 (a) và (b) cho thấy mật rỉ đường là yếu tố có ảnh hưởng lớn đến mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15. Đồ thị mặt đáp ứng cho thấy, nồng độ mật rỉ đường trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn tỉ lệ thuận với mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15, nhưng đến giới hạn nhất định mật độ vi khuẩn giảm dần do nồng độ mật rỉ đường cao sẽ làm thay đổi áp suất thẩm thấu của môi trường, kiềm hãm sự sinh trưởng của vi khuẩn (Lương Đức Phẩm, 1998).



**Hình 3.24.** Mặt đáp ứng giữa các yếu tố. (a) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và mật rỉ đường, (b) Mặt đáp ứng tương tác giữa mật rỉ đường và  $MgSO_4$ , (c) Mặt đáp ứng tương tác giữa cao nấm men và  $MgSO_4$ .

Các loài vi khuẩn nằm trong chi *Pseudomonas* thường sinh trưởng và phát triển tối ưu khi môi trường có tỉ lệ C: N là 20:60 (Peekate và Abu, 2017). Khi nồng độ mật rỉ đường quá cao làm tăng tỉ lệ C trong môi trường nuôi cấy, khiến tỉ lệ C: N bị chênh lệch, từ đó làm mật độ vi sinh vật giảm. Tương tự, nồng độ cao nấm men trong môi trường cũng có ảnh hưởng đáng kể đến mật độ vi khuẩn. Khi nồng độ cao nấm men thay đổi, tỉ lệ N thay đổi làm ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn (Lương Đức Phẩm, 1998).

Tuy nhiên, từ kết quả ở hình 3.24 (a), (c) cho thấy nồng độ cao nấm men ảnh hưởng không nhiều bằng nồng độ mật rỉ đường trong quá trình nhân sinh khối *P. stutzeri* KL15. Bên cạnh đó, nồng độ  $MgSO_4$  trong môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng tương đối khá đến quá trình nhân sinh khối *P. stutzeri* KL15 nhưng sự tác động của yếu tố này không nhiều bằng mật rỉ đường và cao nấm men.

Từ các dữ liệu thu được, các thông số tối ưu cho thành phần môi trường được xác định trong phần mềm DX11 như sau mật rỉ đường 4,95 g/L, cao nấm men 19,08 g/L và MgSO<sub>4</sub> 1,13 g/L, kết quả dự đoán mật độ vi khuẩn tối đa đạt  $2,45 \times 10^{11}$  CFU/mL (11,60 Log.CFU/mL). Tiến hành thí nghiệm tăng sinh vi khuẩn theo thành phần môi trường mô hình đề xuất, cho mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 sau 36 giờ nuôi cấy, nhiệt độ 33 °C, tỷ lệ nạp giống là 2,5% là  $2,37 \times 10^{11}$  CFU/mL khá tương thích với mật độ vi khuẩn mà mô hình đã dự đoán.

Peng và ctv (2014) đã tối ưu hóa thành phần của môi trường lên men giá rẻ để thu sinh khối *P.putida* R-198 và sản xuất axit axetic hòa tan (IAA) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Nồng độ IAA tối đa (18,73 mg/L) được dự đoán trong môi trường chứa 52,41 g/L bột ngô, bột đậu nành 15,82 g/L, 2,40 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,17 g/L MnSO<sub>4</sub> và 5,00 g/L NaCl, mật độ vi khuẩn đạt tối đa  $10^{13}$  CFU/mL. Tác giả Vidakovic và ctv (2017) đã nghiên cứu thành phần tối ưu của môi trường nuôi cấy 2 chủng vi khuẩn *P.stutzeri* là glucose, KNO<sub>3</sub> và peptone khác hoàn toàn với môi trường tối ưu của chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15, có thể các chủng vi khuẩn tuy cùng loài *P. stutzeri* nhưng khi được phân lập ở các điều kiện sinh thái khác nhau thì sẽ phát triển các môi trường lên men khác nhau hoặc các chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* cùng chi khác loài thì sẽ có những điều kiện lên men và thành phần môi trường khác nhau (Lương Đức Phẩm, 1998). Từ các nghiên cứu cho thấy nguồn nitơ, cacbon, các muối vô cơ ảnh hưởng khá nhiều đến việc nhân sinh khối các chủng vi khuẩn và các tác giả cũng nhắm tới việc lựa chọn nguồn nguyên liệu rẻ tiền để có thể lên men vi khuẩn ở qui mô lớn.

### ***Tối ưu hóa thành phần môi trường sản xuất sinh khối vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>***

- *Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng ma trận Plackett – Burman*

Dịch tăng sinh vi khuẩn với các điều kiện khảo sát từ các thí nghiệm đơn, sau khi điều chỉnh đạt mật độ vi khuẩn  $10^8$  CFU/mL được cấy vào môi trường gồm 6 thành phần là mật rỉ đường, cao nấm men, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> và NaCl đã được bố trí theo ma trận Plackett – Burman. Kết quả cho thấy giữa giá trị mô hình và thực nghiệm có sự chênh lệch không đáng kể, có ba thí nghiệm kết quả thực nghiệm

trùng với kết quả dự đoán, ba yếu tố bao gồm glucose, pepton và NaCl là những yếu tố có ảnh hưởng và tác động nhiều nhất đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub>. (phụ lục 2.5.3 – bảng 2.18).

Sau khi xử lý thu được kết quả như sau: từ 6 yếu tố chọn được 3 yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub> đều là các giá trị có ảnh hưởng với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$ ), bao gồm: glucose, pepton và NaCl. Trong khi đó 3 yếu tố gồm K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> và MgSO<sub>4</sub> có mức ảnh hưởng thấp, đồng thời giá trị  $p > 0,05$  nên không có ý nghĩa về mặt thống kê, do đó bị loại bỏ. Dựa vào hệ số ảnh hưởng cho thấy tác động lớn nhất đến mật độ vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub> là NaCl (0,075), sau đó là pepton (0,0683) và glucose (0,0683) (phụ lục 2.5.3 – bảng 2.17). Do đó chọn ba yếu tố này cho thiết kế thí nghiệm theo ma trận Box - Behnken để xác định các thông số tối ưu ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối vi khuẩn.

- *Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn*

Từ ba yếu tố đã được sàng lọc bằng ma trận Plackett - Burman bao gồm glucose, pepton, NaCl tiến hành thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa. Dịch tăng sinh vi khuẩn theo các điều kiện đã khảo sát sẽ được cấy vào môi trường có thành phần được bố trí theo ma trận Box - Behnken (Box và Donald, 1960; Ferreira và ctv, 2007).

Kết quả từ Bảng 3.15 cho thấy mật độ vi khuẩn nằm trong khoảng từ 10,08 Log.CFU/mL đến 10,48 Log.CFU/mL. Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất khi nồng độ thành phần môi trường như sau: glucose 6 g/L, pepton 8 g/L và NaCl 3 g/L. Trong khi đó khi nồng độ các thành phần môi trường gồm glucose 4 g/L, pepton 6 g/L và NaCl 3 g/L thì mật độ vi khuẩn đạt thấp nhất.

**Bảng 3.15.** Thiết kế ma trận Box - Behnken

Thí nghiệm thứ	Glucose (A')	Pepton (B')	NaCl (C')	Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/mL)	
				Thực nghiệm	Mô hình
1	0	0	0	10,46	10,47
2	1	0	1	10,10	10,10
3	1	1	0	10,09	10,09

4	0	-1	1	10,10	10,10
5	0	-1	-1	10,11	10,11
6	-1	-1	0	10,08	10,08
7	-1	1	0	10,21	10,21
8	0	1	-1	10,15	10,15
9	-1	0	-1	10,13	10,13
10	0	0	0	10,46	10,47
11	0	0	0	10,48	10,47
12	0	1	1	10,12	10,12
13	1	0	-1	10,13	10,13
14	-1	0	1	10,13	10,13
15	1	-1	0	10,16	10,16

Từ kết quả phân tích ANOVA được trình bày ở Bảng 3.16, giá trị F-value của mô hình là 557,46 và giá trị p-value < 0,0001 đã chứng tỏ mô hình thí nghiệm được thiết lập có ý nghĩa thống kê cao. Các giá trị của các nhân tố tuyến tính (A', B', C') và giá trị bậc hai (A'<sup>2</sup>, B'<sup>2</sup>, C'<sup>2</sup>), giá trị tương tác A'B' đều thể hiện mức độ có ý nghĩa cao (p-value < 0,05) trong mô hình.

**Bảng 3.16.** Kết quả phân tích ANOVA của thí nghiệm Box - Behnken

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	F-value	p-value	
<b>Model</b>	0,2927	9	0,0325	557,46	< 0,0001	Có ý nghĩa
A' – Glucose	0,0006	1	0,0006	10,50	0,0229	
B' – Pepton	0,0018	1	0,0018	30,86	0,0026	
C' – NaCl	0,0006	1	0,0006	10,50	0,0229	
A'B'	0,0100	1	0,0100	171,43	< 0,0001	
A'C'	0,0002	1	0,0002	3,86	0,1067	
B'C'	0,0001	1	0,0001	1,71	0,2474	
A' <sup>2</sup>	0,1000	1	0,1000	1714,56	< 0,0001	
B' <sup>2</sup>	0,1031	1	0,1031	1767,04	< 0,0001	

C' <sup>2</sup>	0,1191	1	0,1191	2041,33	< 0,0001	
<b>Phần dư</b>	0,0003	5	0,0001			
Sự thiếu phù hợp	0,0000	3	8,333E-06	0,0625	0,9749	Không ý nghĩa
Sai số	0,0003	2	0,0001			
<b>Tổng</b>	0,2930	14	10,19			
				Adeq		
R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Pred</sub>	C.V. %	precision		
0,9990	0,9972	0,9966	0,0749	62,2051		

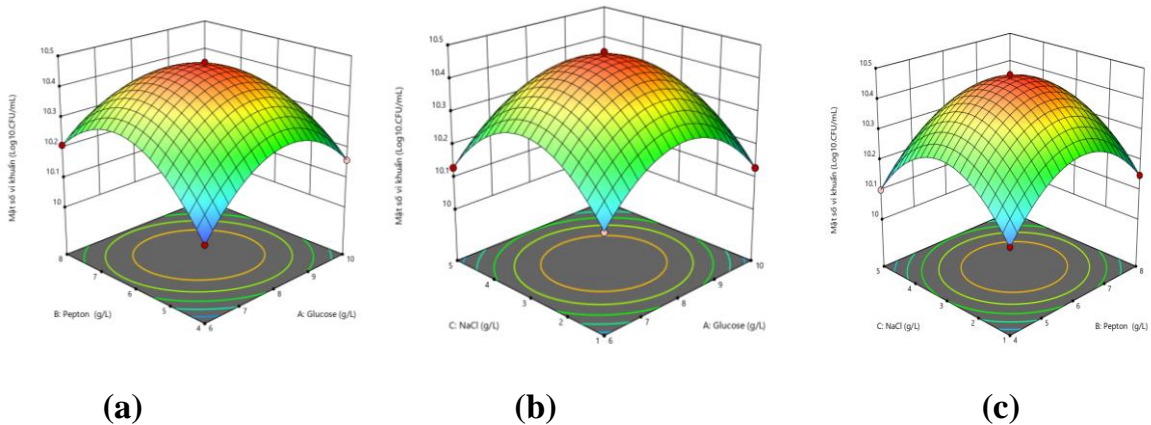
Dựa vào kết quả phân tích (phụ lục 2.5.3 – bảng 2.19), phương trình hồi quy đa biến cho kết quả trên được thể hiện như sau:  $Y_3 = 10,47 - 0,0088A' + 0,0150 B' - 0,0088C' - 0,0500A'B' - 0,1646A'^2 - 0,167B'^2 - 0,1796C'^2$ .

*Trong đó:*  $Y_3$  là mật độ vi khuẩn (Log. CFU/mL),  $A'$  là glucose (g/L),  $B'$  là pepton (g/L),  $C'$  là NaCl (g/L).

Hệ số xác định tương quan  $R^2$  là yếu tố xác định sự phù hợp của mô hình được kiểm chứng. Khi hệ số xác định tương quan  $R^2$  lớn hơn 0,8 thì mô hình có độ tương quan tốt (Guan & Yao, 2008). Mô hình tương quan được xây dựng từ thí nghiệm phải thoả mãn điều kiện với giá trị  $R^2$  cao ( $R^2 = 0,9990$ ) tức có 99,90 % số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu mô hình. Điều này cũng chứng tỏ rằng mô hình phù hợp với các đại diện đầy đủ của các mối quan hệ thực sự giữa các biến được lựa chọn. Theo Montgomery (1984), giá trị p-value của Lack of Fit là 0,9749 ( $> 0,05$ ) phản ánh độ thiếu phù hợp của dữ liệu phải không có ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy sự thay đổi của pepton (p-value = 0,0026) là quan trọng nhất so với hai yếu tố còn lại là glucose và NaCl. Bên cạnh đó, các giá trị bình phương của ba yếu tố đều tác động mạnh mẽ đến mật độ vi khuẩn vì p-value  $< 0,0001$ . Mặt khác, sự tương tác giữa pepton và glucose có ảnh hưởng nhiều nhất đến mật độ vi khuẩn ( $A'B'$ , p-value  $< 0,0001$ ), sự tương tác giữa glucose và NaCl ( $A'C'$ , p-value = 0,1067), sự tương tác giữa pepton và NaCl ( $B'C'$ , p-value = 0,2474) đều ảnh hưởng không nhiều đến mật độ vi khuẩn. Hệ số xác định tương quan  $R^2 = 0,9990$  cho thấy 99,90 % phương sai của mật độ vi khuẩn có thể được giải thích bởi ba yếu tố trên. Đồng thời,  $R^2$  hiệu chỉnh của mô hình cao, ( $R^2_{Adj} = 0,9972$ ) cho thấy mô hình thể

hiện thực tế khá chính xác và  $R^2$  dự đoán ( $R^2_{\text{pred}} = 0,9966$ ) phù hợp với  $R^2$  hiệu chỉnh (sai khác phù hợp là nhỏ hơn 0,20) cho thấy mô hình đã đầy đủ. Adeq Precision (độ chính xác đầy đủ) = 62,2051 thể hiện một tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu tốt (yêu cầu  $>4$ ), điều này cho thấy mô hình phù hợp để đưa vào thực tế.

Hình 3.25 (a) cho thấy yếu tố pepton tác động nhiều đến mật độ vi khuẩn nhiều hơn so với yếu tố glucose, và khi hai yếu tố glucose và pepton tác động với nhau ảnh hưởng rất lớn đến mật độ vi khuẩn. Hình 3.25 (b) yếu tố glucose và NaCl ảnh hưởng không nhiều đến mật độ vi khuẩn, Hình 3.25 (c) yếu tố pepton và NaCl ảnh hưởng không nhiều đến mật độ vi sinh vật. Khi hàm lượng pepton cao thì mật độ vi khuẩn cao nhưng nếu thành phần nitơ trong môi trường lên men vi sinh vật quá cao thì ảnh hưởng đến quá trình tạo sinh khối vi khuẩn. Tỷ lệ C:N phải ở 1 tỷ lệ thích hợp thì vi sinh vật mới phát triển tốt. Nitơ là cấu tử dinh dưỡng quan trọng, là nguyên tố có trong thành phần cấu tạo của vi khuẩn *R. rhodochrous*. Để nuôi cấy *R. rhodochrous* thường sử dụng peptone, cao nấm men, casein, mật rỉ đường và lượng chất dinh dưỡng cung cấp ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn vừa đủ và hợp lý. Nếu cung cấp dinh dưỡng không hợp lý sẽ có tác dụng gây ức chế sự phát triển của vi khuẩn. (Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002).



**Hình 3.25.** Mặt đáp ứng giữa các yếu tố. (a) Mặt đáp ứng tương tác giữa Pepton và Glucose, (b) Mặt đáp ứng tương tác giữa NaCl và Glucose, (c) Mặt đáp ứng tương tác giữa NaCl và Pepton.

Chủng vi khuẩn *R. rhodochrous* khi khảo sát trên môi trường tăng sinh thì chủng lại phát triển tốt nhất trên môi trường NB là môi trường chứa thành phần pepton cao nhất 5g/L, và khi khảo sát môi trường sản xuất sinh khối lỏng cho thấy

pepton vẫn ảnh hưởng nhiều nhất đến quá trình nhân mật độ vi khuẩn, bên cạnh đó, mức yếu tố ảnh hưởng là glucose và NaCl như nhau vì đây là nhóm vi khuẩn chịu mặn nên có thể yếu tố NaCl có tác động đến việc tạo sinh khối. Glucose thì trong môi trường nhân giống thì không có nhưng có thể môi trường sản xuất mức năng lượng cho vi sinh vật cao hơn, đòi hỏi chúng phải có thêm cacbon để phát triển. NaCl cũng có vai trò quan trọng trong phát triển của vi khuẩn, hàm lượng  $\text{Na}^+$  cao trong nhóm vi sinh vật sống ở nước biển hoặc vùng ven biển, tuy nhiên nếu hàm lượng quá cao thì sẽ dẫn đến các ảnh hưởng xấu đến sự phát triển vi sinh vật (Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002). Vương Thị Nga và ctv (2014), tối ưu hóa môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Rhodococcus ruber* TD2 để tạo ra chất hoạt hóa bề mặt sinh học chứa 5,7% (v/v) dầu DO; 3,3 g/l  $\text{NaNO}_3$  và pH 8,3. Tác giả Singh và ctv (2017), nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện và môi trường enzyme Nhase từ vi khuẩn *Rhodococcus pyridinivorans* NIT-36, với môi trường Yeast extract- 0.10 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - 0.01 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - 0.01 %,  $\text{MgSO}_4$ - 0.10 % and Glycerol- 10% ở pH là 9, thời gian 24 giờ với nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ . Một nghiên cứu của tác giả Sahu và ctv (2020), tối ưu hóa môi trường sinh enzyme nitrile hydratase (NHase) của vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* (RS-6) với glycerol là 1%, urea 0,75% ở nhiệt độ  $33^\circ\text{C}$ , pH 7, thời gian nuôi cấy 48 giờ, kết quả cho thấy enzyme sinh ra tăng 6,22 lần so với môi trường ban đầu chưa tối ưu hóa. Theo các nghiên cứu trong và ngoài nước tham khảo thì các chủng vi sinh vật thuộc chi *Rhodococcus* có khả năng sinh tổng hợp enzyme Nhase trong sản xuất Acrylamide hay tạo chất hoạt hóa bề mặt sinh học nhưng trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *R. rhodochrous* phân lập từ vùng nuôi tôm hùm có khả năng chuyển hóa các hợp chất ammonia, nitrite, nitrate, nghiên cứu cũng đã tối ưu hóa môi trường tạo sinh khối vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản. Vì mục đích nghiên cứu khác nhau nên thành phần và hàm lượng môi trường khảo sát cũng khác nhau. Hiện nay, các tài liệu sử dụng chủng vi khuẩn này để xử lý các hợp chất nitơ trong ao nuôi thủy sản cũng như tối ưu hóa thành phần môi trường để sản xuất sinh khối vi khuẩn này rất hạn chế nên không thể so sánh với các nghiên cứu khác.

Từ các dữ liệu thu được, thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn *R.*



*rhodochrous* T<sub>9</sub> được xác định trong mô hình như sau: glucose 7,93 g/L, pepton 6,1 g/L và NaCl 2,95 g/L, kết quả dự đoán mật độ vi khuẩn trong phần mềm DX11 tối đa đạt  $2,93 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,467Log.CFU/mL). Thử nghiệm nuôi cấy vi khuẩn theo môi trường mà mô hình đề xuất, cho kết quả mật độ vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> sau 36 giờ nuôi cấy, nhiệt độ 33 °C, tỷ lệ nạc giống là 2,5% là  $2,52 \times 10^{10}$  CFU/mL (10,40 Log.CFU/mL) khá tương thích với mật độ vi khuẩn mà mô hình đã dự đoán.

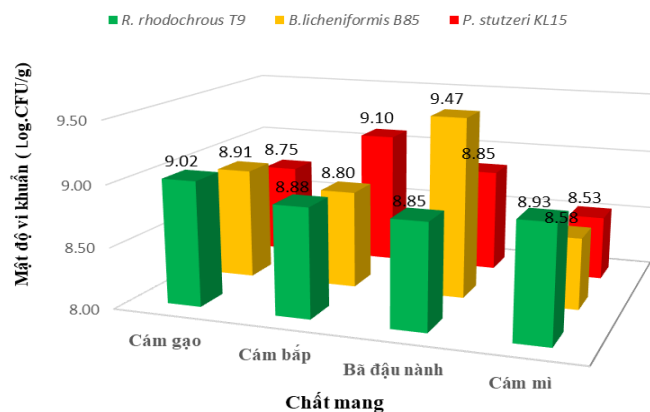
Vậy, ba chủng vi khuẩn được nhân sinh khối trong môi trường sản xuất lỏng có thành phần môi trường đã được tối ưu hóa, kết quả cho thấy mật độ vi khuẩn *B. licheniformis* B85 là  $3,14 \times 10^{11}$  CFU/mL, mật độ vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 là  $2,37 \times 10^{11}$  CFU/mL, *R. rhodochrous* T<sub>9</sub> là  $2,52 \times 10^{10}$  CFU/mL.

### 3.2.2. Tạo chế phẩm vi sinh dạng bột

#### 3.2.2.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện sản xuất của các chủng vi khuẩn trên môi trường bán rắn

##### *Khảo sát môi trường ảnh hưởng đến sinh khối các chủng vi khuẩn*

Ba chủng vi khuẩn được pha loãng mật độ vi khuẩn về  $10^8$  CFU/mL, cấy vào các môi trường như cám gạo, cám bắp, cám mì và bã đậu nành trong thời gian 48 giờ, nhiệt độ phòng, độ ẩm 50% với tỷ lệ nạc giống là 5%.



**Hình 3.26.** Khảo sát các môi trường

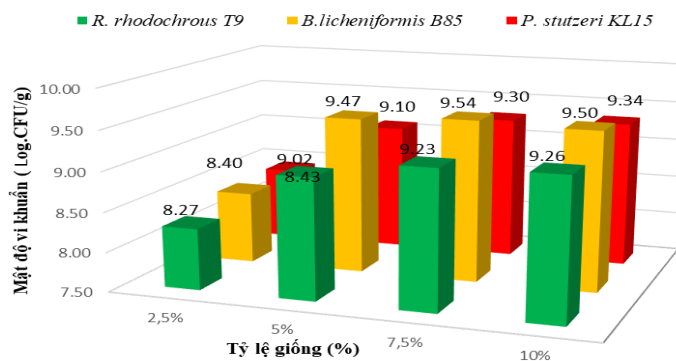
Hình 3.26 ( phụ lục 2.6.1 - bảng 2.17) cho kết quả chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 phát triển tốt nhất trên môi trường là bã đậu nành với mật độ  $2,9 \times 10^9$  CFU/gam, mật độ vi khuẩn phát triển tốt hơn so với các môi trường còn lại.

Chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 phát triển tốt nhất trên môi trường có chất mang là cám bắp có mật độ  $1,27 \times 10^9$  CFU/mL, chủng *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> phát triển tốt nhất trên môi trường là cám gạo với mật độ  $1 \times 10^9$  CFU/gam. Trong sản xuất chế phẩm vi sinh, thường sẽ chuyển qua dạng bột vì dễ dàng vận chuyển và bảo quản lâu hơn. Do đó, vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 sẽ nuôi cấy trên môi trường chứa chất mang là bã đậu nành, *Pseudomonas stutzeri* KL15 là cám bắp và *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> là cám gạo.

Theo xử lý thống kê, các chủng vi khuẩn trên môi trường chứa chất mang tốt nhất đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các môi trường còn lại. Đây là phương pháp lên men bề mặt của nhóm vi khuẩn hiếu khí, thành phần môi trường thường chứa cả tinh bột và protein và trộn thêm các khoáng chất nhằm hỗ trợ thêm chất dinh dưỡng cho vi khuẩn phát triển (Trần Thị Thanh, 2000).

### **Khảo sát tỷ lệ nạp giống ảnh hưởng đến sinh khối các chủng vi khuẩn**

Từ các môi trường phù hợp đã nghiên cứu ở nội dung trên, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong thời gian 48 giờ, nhiệt độ phòng, độ ẩm 50% với tỷ lệ nạp giống là 2,5%, 5%, 7,5% và 10%. Ở môi trường bán rắn, không khảo sát mật độ vi khuẩn bổ sung mà chỉ khảo sát tỷ lệ giống vì thừa kế từ môi trường tăng sinh và môi trường sản xuất lỏng (mật độ vi khuẩn là  $10^8$  CFU/mL). Do đó, chọn mật độ  $10^8$  CFU/mL cho các chủng vi khuẩn và chỉ khảo sát các tỷ lệ giống bổ sung vào môi trường bán rắn.



**Hình 3.27.** Khảo sát tỷ lệ nạp giống

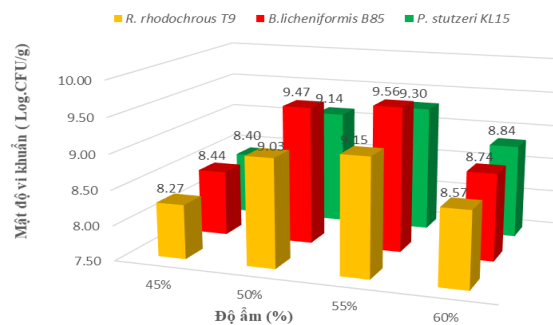
Hình 3.27 (phụ lục 2.6.1 – bảng 2.18), chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 phát triển tốt nhất với tỷ lệ giống là 7,5 % có mật độ  $3,4 \times 10^9$  CFU/gam tuy

nhiên theo xử lý thống kê thì mật độ vi khuẩn ở 3 nồng độ 5%, 7,5% và 10% của chủng vi khuẩn *B.licheniformis* B85 không có sự khác biệt có ý nghĩa, do đó để có hiệu quả kinh tế, chọn tỷ lệ giống là 5% bổ sung vào môi trường bán rắn cho vi khuẩn *B.licheniformis* B85. Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 phát triển tốt nhất với tỷ lệ giống là 10% có mật độ  $2 \times 10^9$  CFU/mL, tuy nhiên mật độ vi khuẩn KL 15 ở tỷ lệ giống 7,5% là  $2 \times 10^9$  CFU/mL. Xét ý nghĩa thống kê, giữa hai nghiệm thức này không có sự khác biệt nên chọn tỷ lệ giống cho chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 là 7,5%. Tương tự chủng *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> phát triển tốt nhất với mật độ 10% ( $1,8 \times 10^9$  CFU/gam), tuy nhiên mật độ vi khuẩn giữa các tỷ lệ 5%, 7,5% và 10% không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, nên chọn mật độ vi khuẩn cho môi trường bán rắn là 5%. Trong môi trường sản xuất, thành phần là các nguồn nitơ thô còn gọi là nguồn nitơ kỹ thuật, thường những môi trường này thì vi sinh vật phải cần một thời gian dài để thích nghi và sử dụng các thành phần trong môi trường, do đó để việc lên men bán rắn với thời gian nhanh hơn thì sẽ cần lượng giống nhiều hơn môi trường lỏng (Trần Thị Thanh, 2000).

Tóm lại, tỷ lệ giống để bổ sung vào môi trường bán rắn cho vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> là 5% và vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 là 7,5%.

### **Khảo sát độ ẩm ảnh hưởng đến sinh khối các chủng vi khuẩn**

Các chủng vi khuẩn sau khi được nhân sinh khối trong môi trường sản xuất lỏng đã được tối ưu hóa, cấy vào các môi trường phù hợp đã nghiên cứu ở nội dung 4.9.1, 4.9.2, ủ trong thời gian 48 giờ, nhiệt độ phòng, khảo sát độ ẩm 45%, 50%, 55% và 60%.



**Hình 3.28.** Khảo sát độ ẩm nuôi cấy

Chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 phát triển tốt nhất độ ẩm 55% có mật độ vi khuẩn là  $3,6 \times 10^9$  CFU/gam tuy nhiên theo xử lý thống kê thì mật độ vi khuẩn ở hai độ ẩm 50, 55% không có sự khác biệt có ý nghĩa, do đó chọn độ ẩm 55% để có mật độ cao nhất. Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 phát triển tốt nhất ở độ ẩm 55% có mật độ  $2 \times 10^9$  CFU/mL, nghiệm thức độ ẩm 55% có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại, do đó chọn độ ẩm 55% cho môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn này. Tương tự *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> phát triển tốt nhất ở độ ẩm 55% với mật độ  $1,42 \times 10^9$  CFU/gam, mật độ vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> ở độ ẩm 50% là  $1 \times 10^9$  CFU/mL. Xét ý nghĩa thống kê, giữa hai nghiệm thức này không có sự khác biệt nên có thể chọn một trong hai độ ẩm để nhân sinh khối. Trong lên men bán rắn, độ ẩm cũng ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối của vi khuẩn, nếu độ ẩm quá thấp hay quá cao thì quá trình nhân sinh khối đều bị ảnh hưởng, môi trường lên men bán rắn độ ẩm của nguyên liệu môi trường phải từ 60-75%. Sự có mặt của nước giúp vi sinh vật hấp thu chất dinh dưỡng từ môi trường dễ dàng hơn (Trần Thị Thanh, 2000).

Tóm lại, độ ẩm để bổ sung vào môi trường bán rắn cho vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>, vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 là 55%.

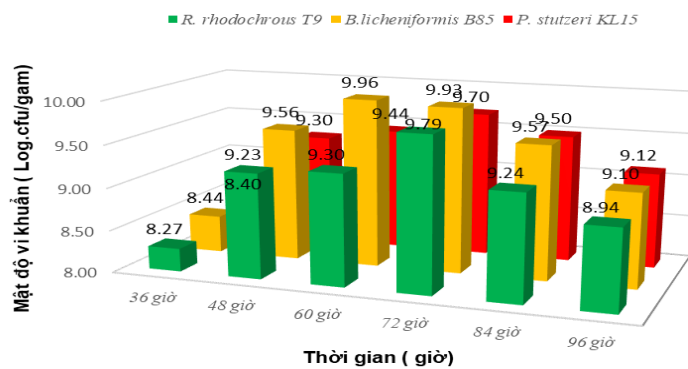
#### **Khảo sát thời gian ảnh hưởng đến sinh khối các chủng vi khuẩn**

Thí nghiệm khảo sát thời gian nuôi cấy từ 36, 48, 60, 72, 84, 96 giờ cho 3 chủng vi khuẩn trên môi trường bán rắn cho thấy khoảng thời gian nuôi cấy tốt nhất trong khoảng 48 – 84 giờ. Kết quả thể hiện ở phụ lục 2.6.1 – bảng 2.20

Chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 phát triển tốt nhất với thời gian là 60 giờ có mật độ  $9,2 \times 10^9$  CFU/gam, theo xử lý thống kê thì mật độ vi khuẩn ở thời gian 60 giờ của chủng vi khuẩn B85 không có sự khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức thời gian 72 giờ (mật độ vi khuẩn là  $8,5 \times 10^9$  CFU/gam), do đó để có hiệu quả kinh tế, chọn thời gian là 60 giờ để thu nhận mật độ vi khuẩn trong môi trường bán rắn cho vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85.

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 phát triển tốt nhất với thời gian 72 giờ có mật độ  $5,1 \times 10^9$  CFU/mL. Xét thống kê, nghiệm thức 72 giờ này có sự

khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức còn lại nên chọn thời gian cho chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 là 72 giờ. Tương tự chủng *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> phát triển tốt nhất với thời gian 72 giờ có mật độ  $4,9 \times 10^9$  CFU/mL. Xét thống kê, nghiệm thức 72 giờ này có sự khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức còn lại nên chọn thời gian cho chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> là 72 giờ. Tóm lại, thời gian nuôi cấy cho chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 là 60 giờ và chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> là 72 giờ.



**Hình 3.29.** Khảo sát thời gian nuôi cấy

Tác giả Trần Hữu Tâm (2014), đã nghiên cứu qui trình pilot sản xuất sinh khối 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. để tạo probiotic cung cấp carotenoid với nguồn cơ chất là đậu nành trong môi trường có agar với thời gian 48h, sau đó đông khô tế bào vi khuẩn để tạo probiotic, thử nghiệm trên chuột. Do ứng dụng chế phẩm vi sinh cho hai mục đích khác nhau, nên thành phần và phương pháp làm khác nhau nên không thể so sánh kết quả.

### 3.2.2.2. Tạo chế phẩm vi khuẩn dạng bột

Ba chủng vi khuẩn được nhân lên từ môi trường bán rắn theo điều kiện đã khảo sát, đem đi sấy ở điều kiện nhiệt độ  $40^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 2 -3 ngày. Các sản phẩm được sấy khô về độ ẩm 10 - 15%, sau đó nghiền mịn, được đếm lại mật độ vi khuẩn để có thể tiến hành trộn với các chất phụ gia. Mật độ vi khuẩn được đếm lại sau khi sấy khô và nghiền mịn. Sau khi sấy khô thì tế bào vi khuẩn mất nước nên sẽ có một số tế bào vi khuẩn bị chết đi. Nhóm vi khuẩn nào có khả năng tạo bào tử sẽ chuyển thành bào tử và khi có điều kiện dinh dưỡng và độ ẩm, nhiệt độ

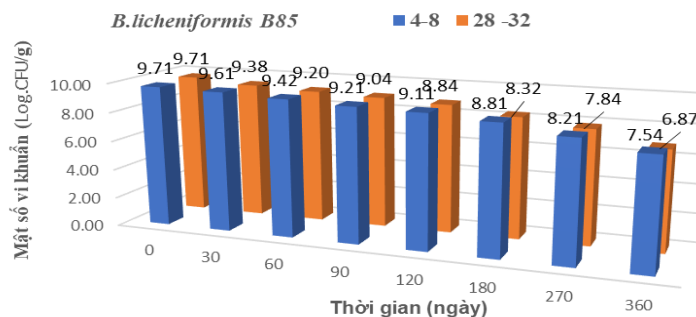
phù hợp thì nhóm vi khuẩn sẽ phát triển, còn những chủng vi khuẩn không có khả năng tạo bào tử, tế bào sinh dưỡng khi qua giai đoạn sấy, một phần tế bào chết đi và mật độ vi khuẩn giảm. Giai đoạn nghiền cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn vì có sử dụng nhiệt độ cao trong một thời gian ngắn. Các chế phẩm vi khuẩn dạng bột được tính toán trộn với nhau theo tỷ lệ phù hợp để đưa ra mật độ vi khuẩn cho hỗn hợp chế phẩm là  $1 \times 10^9$  CFU/gam cho từng chủng vi khuẩn.

**Bảng 3.17.** Mật độ vi khuẩn sau khi nghiền và sấy

Stt	Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/gam)
1	<i>Bacillus licheniformis</i> B85	$5,1 \times 10^9$
2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> KL15	$3,3 \times 10^9$
3	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	$1,8 \times 10^9$

Theo tính toán lý thuyết, số lượng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 là 200 gam, *Pseudomonas stutzeri* KL15 là 300 gam và *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> là 500 gam, trộn với nhau thành 1 kg sẽ cho mật độ  $10^9$  CFU/gam cho mỗi con vi khuẩn. Hỗn hợp chế phẩm vi sinh cũng được pha loãng theo các nồng độ và tiến hành đo OD<sub>600nm</sub>, từ đường cong tăng trưởng chuyển ra mật độ vi khuẩn là  $1,2 \times 10^9$  CFU/gam. Hỗn hợp chế phẩm vi sinh tiếp tục được phối với chất phụ gia là dextrose, với tỷ lệ 150 gam hỗn hợp vi sinh với 850 gam dextrose, dùng phương pháp đo OD<sub>600nm</sub>, kết quả cho tổng mật độ vi khuẩn cho kết quả  $1,5 \times 10^8$  CFU/gam, đem sử dụng cho nội dung 3.

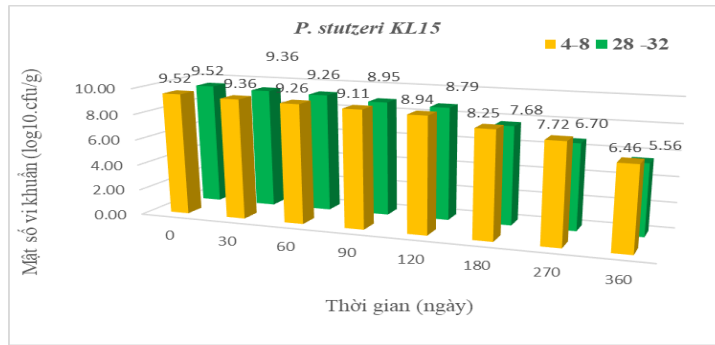
### Khảo sát điều kiện bảo quản chế phẩm vi sinh



**Hình 3.30.** Khảo sát điều kiện bảo quản của vi khuẩn *B. licheniformis*

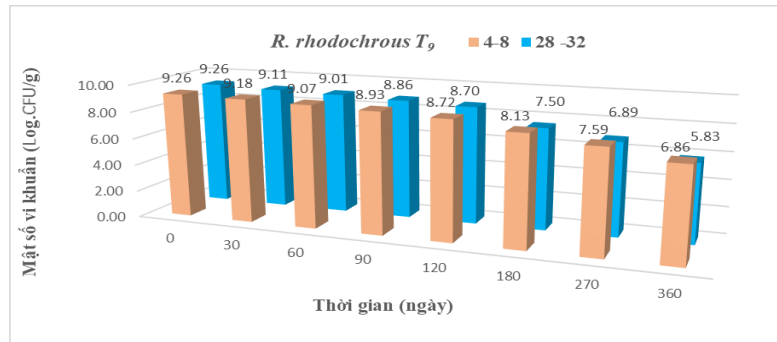
Hình 3.30, cho thấy vi khuẩn *B. licheniformis* B85, khi bảo quản ở nhiệt độ 4 - 8°C

trong 180 ngày, mật độ vi khuẩn giảm nhẹ, ban đầu từ  $5,1 \times 10^9$  CFU/g xuống còn  $7 \times 10^8$  CFU/g. Sau 360 ngày, mật độ vi khuẩn giảm còn  $3,5 \times 10^7$  CFU/g. Ở nhiệt độ 28-32° C, mật số vi khuẩn *B. licheniformis* B85 sau 120 ngày giảm xuống còn  $8,3 \cdot 10^8$  CFU/g, sau 270 ngày mật số vi khuẩn tiếp tục giảm xuống còn  $10^7$  CFU/g và sau 360 ngày, mật số vi khuẩn giảm xuống còn  $3,5 \times 10^6$  CFU/g.



**Hình 3.31.** Khảo sát điều kiện bảo quản của vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

Đối với vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 ở hình 3.31, bảo quản ở mức nhiệt độ 4 - 8° C, 120 ngày thì mật độ vi khuẩn giảm xuống còn  $10^8$  CFU/g, sau 360 ngày mật độ vi khuẩn giảm xuống  $10^6$  CFU/g. Còn ở mức nhiệt độ 28-32°C, thì sau 90 ngày mật độ vi khuẩn của 2 chủng *P. stutzeri* KL15 giảm từ  $10^9$  CFU/g xuống còn  $10^8$  CFU/g và sau 360 ngày bảo quản, mật độ vi khuẩn giảm còn  $10^5$  CFU/g



**Hình 3.32.** Khảo sát điều kiện bảo quản của vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub>

Đối với vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> ở hình 3.32 cho thấy bảo quản ở mức nhiệt độ 4 – 8°C, 120 ngày thì mật độ vi khuẩn giảm xuống còn  $10^8$  CFU/gam, sau 360 ngày mật độ vi khuẩn giảm xuống  $10^6$  CFU/g. Còn ở mức nhiệt độ 28-32°C, thì sau 90 ngày mật độ vi khuẩn của *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> giảm từ  $10^9$  CFU/g xuống còn  $10^8$  CFU/g và sau 360 ngày bảo quản, mật độ vi khuẩn giảm còn  $10^5$  CFU/g.

Tóm lại, bảo quản ở điều kiện nhiệt độ từ 4 – 8°C, vi khuẩn được bảo quản tốt

hơn, mật độ vi khuẩn có giảm nhẹ sau 120 ngày bảo quản và sau 360 ngày, chủng vi khuẩn *B. licheniformis* B85 giảm còn  $10^7$  CFU/g, còn 2 chủng vi khuẩn còn lại là  $10^6$  CFU/g. Đối với bảo quản ở nhiệt độ 28-32°C, mật độ vi khuẩn giảm nhẹ sau 180 ngày và sau 360 ngày, mật số vi khuẩn *B. licheniformis* B85 giảm còn  $10^6$  CFU/g, hai chủng vi khuẩn giảm xuống còn  $10^5$  CFU/g. Đặc biệt, chủng vi khuẩn *B. licheniformis* B85 là nhóm vi khuẩn sinh bào tử nên sau thời gian bảo quản 360 ngày, có mật số vi khuẩn cao hơn so với 2 chủng vi khuẩn còn lại.

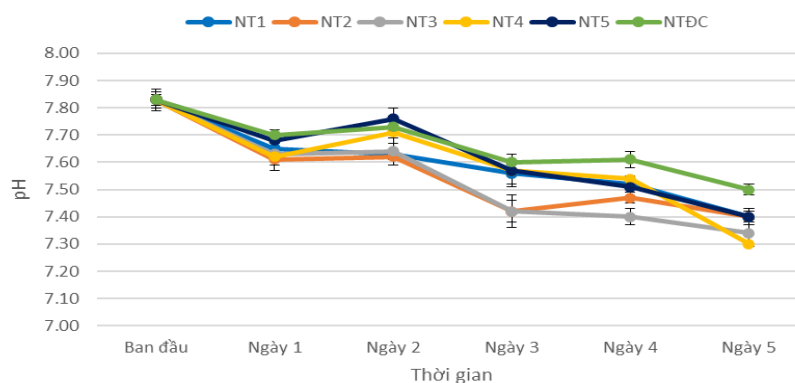
### 3.3. Nội dung 3: Đánh giá chuyển hóa nitơ của các chủng vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản.

#### 3.3.1. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong nước nuôi tôm thẻ chân trắng (không có tôm) ở qui mô phòng thí nghiệm.

##### 3.3.1.1. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn.

###### *Theo dõi pH môi trường nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng (không có tôm)*

Nước nuôi tôm thẻ chân trắng được đem về từ Cần Giờ là 400L, chứa vào can 20L, có sục khí oxy. Tiến hành bổ sung chế phẩm vi sinh theo các tỷ lệ 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% với mật độ vi sinh vật là  $10^8$  CFU/gam.



**Hình 3.33.** Chỉ tiêu pH theo dõi hàng ngày

Theo dõi các chỉ tiêu pH, hàm lượng ammonia, nitrite, nitrate và tổng vi khuẩn hiếu khí, mật độ vi khuẩn AOB, NOB trong thời gian 5 ngày ở nhiệt độ phòng. Nhiệt độ nước trong can được đo vào các buổi sáng, do động từ 28 - 30°C và chiều trong khoảng 30 - 32°C. Tất cả các NT có bổ sung vi khuẩn sau 5 ngày đều có xu hướng pH giảm nhưng giảm rất ít, sau 5 ngày vẫn duy trì ở mức pH = 7,3 - 7,8.

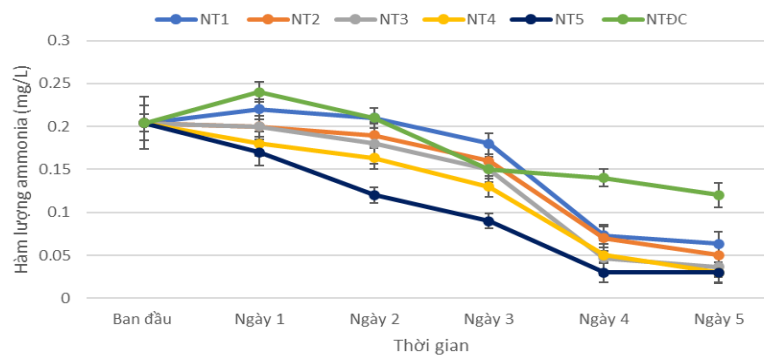
Nhìn chung, pH ở Hình 3.33 dù có giảm nhưng vẫn duy trì ở mức độ cho phép



với môi trường nước nuôi tôm thẻ chân trắng (7,0 – 8,5), pH có xu hướng giảm là hoàn toàn phù hợp với xu hướng giảm hàm lượng ammonia có trong nước ao.

### ***Khảo sát chuyển hóa ammonia trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng***

Khi pH giảm, sự chuyển đổi từ  $\text{NH}_4^+$  sang  $\text{NH}_3$  sẽ giảm, kết hợp với điều kiện sục khí liên tục hợp thành tổ hợp điều kiện giúp nhóm vi khuẩn hiếu khí oxy hóa  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  thành  $\text{NO}_2^-$  dễ dàng hơn và sự phân hủy chất hữu cơ ở đáy ao sẽ diễn ra nhanh chóng khi pH ở ngưỡng 7 – 8 (Boyd, 1998).



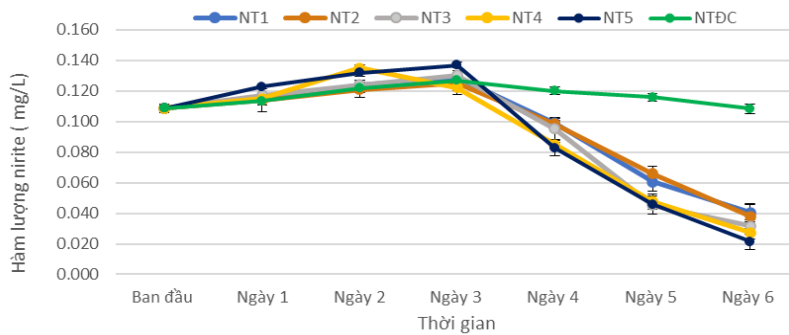
**Hình 3.34.** Hàm lượng ammonia theo dõi hàng ngày

Ở hình 3.34, nước nuôi tôm thẻ chân trắng ban đầu phân tích có hàm lượng ammonia là 0,204 mg/l. Sau 4 ngày ở 5 can có bổ sung chế phẩm hỗn hợp vi khuẩn xử lý thì nồng độ ammonia giảm xuống ngưỡng < 0,1 mg/l, lượng ammonia giảm theo thứ tự tỷ lệ chế phẩm vi khuẩn bổ sung từ cao đến thấp, ở NTĐC cũng có giảm nhưng chưa đạt ngưỡng nồng độ ammonia  $\leq 0,1$  mg/l. Sau 5 ngày theo dõi, hàm lượng ammonia ở các NT 1, 2, 3, 4, 5 tiếp tục giảm xuống  $\leq 0,06$  mg/L, riêng NTĐC có hàm lượng ammonia là 0,12 mg/L. Vậy khi bổ sung mật độ vi khuẩn bổ sung với tỷ lệ 0,3%, 0,4% và 0,5% sau 5 ngày đều cho hiệu suất xử lý ammonia lớn hơn 80 % tương ứng với hàm lượng ammonia là 0,04 mg/L (NT3) và 0,03 mg/L (NT4, NT5). Ở NT5 bổ sung tỷ lệ 0,5% vi khuẩn với mật độ  $10^8$  CFU/gam xử lý ammonia tốt nhất, ở ngày thứ 3 đã làm hàm lượng ammonia giảm xuống còn 0,09 mg/L tương ứng hiệu suất xử lý 56%, qua 5 ngày hàm lượng ammonia giảm còn 0,03 mg/L tương ứng với hiệu suất xử lý đạt được 85,31%. Điều này chứng tỏ khi có sự kết hợp nhiều nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ lại với nhau và bổ sung mật số vi khuẩn cao thì khả năng xử lý ammonia sẽ tốt hơn. Xét về mặt thống kê, NT3

(0,3%), NT4 (0,4%), NT5 (0,5%) không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (phụ lục 3.1 – bảng 3.2) và 3 nghiệm thức này có sự khác biệt với NT1, NT2 và NTĐC. Tuy nhiên khi mở rộng ứng dụng vấn đề này, về mặt hiệu quả kinh tế, nếu chế phẩm vi sinh được phép bổ sung vào ao nuôi tôm thẻ với tỷ lệ vi sinh 0,5% thì có thể sẽ khá đắt tiền, ảnh hưởng đến khoảng chi phí cho việc sử dụng chế phẩm vi sinh của người nuôi tôm. Từ kết quả và những phân tích trên, quyết định thử nghiệm mật độ vi khuẩn nitrite hóa thích hợp cần bổ sung vào bể ương nuôi tôm thẻ chân trắng giai đoạn post 5 ở qui mô  $1\text{m}^3$  để cải thiện hàm lượng ammonia là  $10^8$  CFU/g với liều lượng 0,3 %, 0,4% và 0,5%.

### ***Khảo sát chuyển hóa nitrite trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng***

Hình 3.35, nhìn chung hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  ở các NT ban đầu không cao với hàm lượng 0,1086 mg/L và sau 6 ngày theo dõi, lượng nitrite ở các NT có bổ sung vi sinh có tăng nhẹ vào ngày thứ 1 đến ngày thứ 3, sau đó giảm khi chuyển qua ngày thứ tư đến thứ 6. Do trong quá trình hoạt động từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 3, các chủng vi khuẩn chuyển hóa ammonia sau 24 giờ và tạo ra sản phẩm là nitrite, làm hàm lượng nitrite tăng lên.



**Hình 3.35.** Hàm lượng nitrite theo dõi hàng ngày

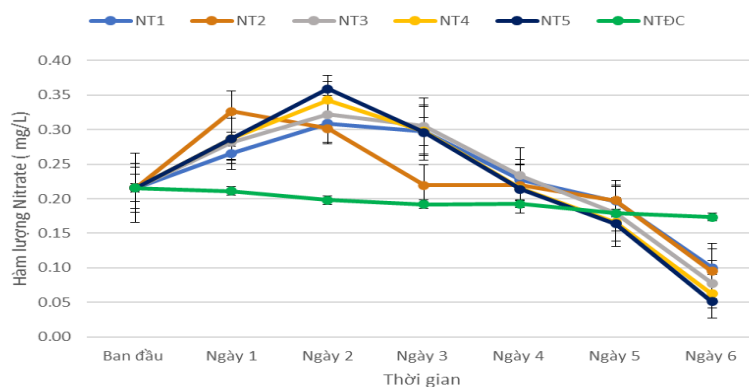
Sau thời gian 3 ngày, các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitrite thành nitrate, do đó làm hàm lượng nitrite bị giảm xuống. Nghiệm thức có bổ sung vi sinh vật thì nitrite giảm nhanh so với nghiệm thức đối chứng và hàm lượng nitrite ở 5 NT bổ sung vi sinh giảm xuống còn từ 0,0214 – 0,0405 mg/L, điều này chứng tỏ nhóm vi khuẩn nitrite hóa bổ sung đã bắt đầu hoạt động và thích nghi dần với môi trường nước ương nuôi ấu trùng tôm thẻ chân trắng. Riêng nghiệm thức đối chứng, không bổ sung vi sinh vật từ bên ngoài mà chỉ có các chủng vi khuẩn nitrate hóa trong

nước nên việc chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  chậm và hầu như giảm rất ít. Xét về thống kê (phụ lục 3.1 – bảng 3.3), sau 6 ngày theo dõi, nghiệm thức NT4 và NT5 có không có sự khác biệt có ý nghĩa, nghiệm thứ NT3 có sự khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức NT5 nhưng lại không có sự khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức NT4.

Tóm lại, nghiệm thức bổ sung chế phẩm vi sinh 0,5% (NT5) có hàm lượng nitrite là 0,0214 mg/L tương ứng hiệu suất chuyển hóa nitrite là 80,29% là nghiệm thức giảm nhiều nhất. Hàm lượng nitrite còn 0,0274 mg/L tương ứng hiệu suất chuyển hóa nitrite 74,77% ở nghiệm thức bổ sung chế phẩm vi sinh 0,4% (NT4), hàm lượng nitrite ở nghiệm thức 0,3 % (NT3) là 0,0319 mg/L tương ứng hiệu suất chuyển hóa 70,63% tuy nhiên khi sử dụng chế phẩm ở qui mô lớn hơn có thể xem xét sử dụng ở nghiệm thức 0,3% và 0,4% để có hiệu quả về kinh tế. Theo Boyd (1998) hàm lượng nitrite trong ao nuôi tôm chủ yếu do thức ăn thừa và quá trình bài tiết của tôm nuôi. Nitrite là hợp chất nitơ gây độc cho các động vật thủy sản, trong đó có tôm, khi nồng độ nitrite cao sẽ kết hợp với hemocyanin trong máu tôm làm mất khả năng vận chuyển oxy trong máu khiến tôm nuôi bị ngạt. Khi đó tôm sẽ yếu, dễ mắc bệnh hoặc chết vì sốc môi trường, cho rằng đối với ao nuôi thủy sản nồng độ nitrite nhỏ hơn 0,3 mg/L. Theo Whetstone và ctv (2002) nồng độ nitrite trong ao nuôi tôm phải nhỏ hơn 0,23 mg/L được xem là an toàn.

### ***Khảo sát chuyển hóa nitrate trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng***

Trên biểu đồ Hình 3.36 hàm lượng nitrate ở các NT ban đầu thấp chỉ có 0,2156 mg/L và sau 6 ngày theo dõi, lượng nitrate có tăng nhẹ từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 3 và giảm từ ngày thứ tư đến ngày thứ sáu.



**Hình 3.36.** Hàm lượng nitrate theo dõi hàng ngày

Riêng nghiệm thức đối chứng, hàm lượng nitrate hầu như giảm nhẹ từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 6, vì do mật độ vi sinh vật nitrate hóa và khử nitrate trong nước nuôi tôm thẻ chân trắng thấp, lại không được bổ sung vi sinh vật bên ngoài vào nên hàm lượng  $\text{NO}_3^-$  không được khử để chuyển thành N phân tử. Các nghiệm thức có bổ sung vi sinh thì quá trình chuyển hóa từ  $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$  giúp cho sự thay đổi trong môi trường nước tốt hơn, hàm lượng nitrate giảm từ ngày thứ tư đến ngày thứ 6 thì chứng tỏ nhóm vi khuẩn đã bắt đầu hoạt động và thích nghi dần với môi trường.

Tóm lại, sau 6 ngày, nghiệm thức 0,5% (NT5) chuyển hóa nitrate với hiệu suất là 76,11% (tương ứng hàm lượng nitrate còn là 0,0515 mg/L), nghiệm thức 0,4% (NT4) chuyển hóa nitrate với hiệu suất là 70,92% tương ứng hàm lượng nitrate còn 0,0627 mg/L, NT3 là 64,08% tương ứng hàm lượng nitrate 0,0774 mg/L. Cho thấy, nghiệm thức NT5 có hàm lượng nitrate giảm nhiều nhất so với các nghiệm thức còn lại. Nhưng xét về mặt thống kê (phụ lục 3.1 – bảng 3.4), nghiệm thức NT3 và NT4 không có khác biệt có ý nghĩa và nghiệm thức NT4 và NT5 không có sự khác biệt có ý nghĩa, tuy nhiên nghiệm thức NT3 và NT5 lại có sự khác biệt có ý nghĩa.

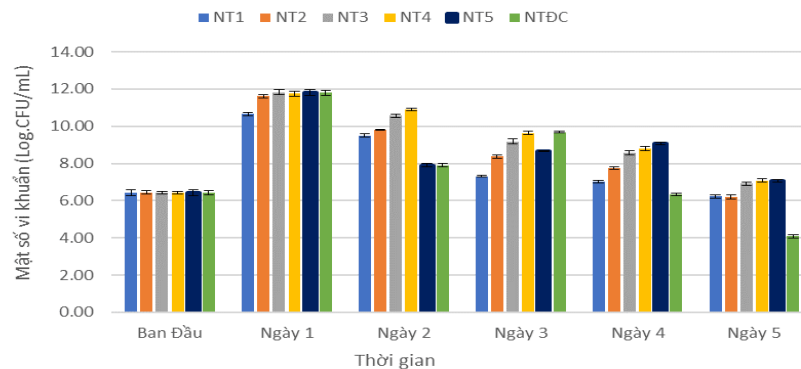
Do đó, cần thử nghiệm cả 3 NT3, NT4, NT5 ở qui mô lớn hơn nhằm lựa chọn tỷ lệ vi sinh thích hợp cho hiệu quả kinh tế. Theo Zweig và ctv (1999) nitrate là sản phẩm cuối cùng của quá trình nitrate hóa và nồng độ thường cao hơn cả ammonia và nitrit nhưng ít độc hơn. Nồng độ nitrate cao có thể ảnh hưởng đến quá trình thẩm thấu và vận chuyển oxy, nhưng nồng độ độc hại cao hơn nhiều so với ammonia và nitrite (Lawson, 1995). Nồng độ nitrate cao cũng có thể dẫn đến hiện tượng phú dưỡng, phát triển quá mức của tảo và thực vật thủy sinh, có thể có tác động tiêu cực đến các loài thủy sản nuôi (Zweig và ctv., 1999). Zhang (2020), đã khảo sát được tỷ lệ C/N là 10 với nguồn cacbon là glucose, pH 7, nhiệt độ 30°C, bốn chủng vi sinh vật *Pseudomonas sp.*, *Sphingobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.* theo tỷ lệ 1:1:1:1 thì chuyển hóa ammonia trong nước thải trang trại chăn nuôi lợn đã chuyển hóa được khoảng 20,56% ammonia. Tóm lại, các chủng vi khuẩn khi phối hợp theo các tỷ lệ đã cho khả năng chuyển hóa ammonia, nitrite, nitrate trên 80% khi bổ sung vào môi trường nước ao tôm thẻ chân trắng (không có tôm), làm tiền đề

cho việc ứng dụng chế phẩm vi sinh vào ương giống tôm thẻ chân trắng.

### 3.3.1.2. Đánh giá mật độ vi sinh vật khi bổ sung chế phẩm vi sinh.

#### • Tổng vi khuẩn hiếu khí

Mật độ vi khuẩn hiếu khí trong nước nuôi tôm thẻ chân trắng ban đầu khi lấy về phòng thí nghiệm là  $2,7 \times 10^6$  CFU/mL, sau khi bổ sung hỗn hợp vi sinh theo các tỷ lệ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 % với mật độ vi khuẩn là  $10^8$  CFU/g vào các can 20L chứa nước nuôi tôm thẻ chân trắng cho thấy tổng vi sinh vật hiếu khí có mật độ từ  $4,5 \times 10^{10}$  CFU/mL đến  $6,2 \times 10^{11}$  CFU/mL. Đến ngày thứ 2 vi sinh bắt đầu hoạt động sử dụng ammonia như nguồn thức ăn và chuyển hóa thành nitrite, nitrate tuy nhiên hàm lượng vi sinh vật giảm nhanh trong thời gian 2 – 5 ngày sau khi cho vào môi trường nước. Đến ngày thứ năm, NTĐC có tổng vi khuẩn hiếu khí còn  $1,2 \times 10^3$  CFU/mL và nghiệm thức NT1, NT2, NT3 là  $1,6 - 8,1 \times 10^6$  CFU/mL, NT4, NT5 là  $1,2 - 1,5 \times 10^7$  CFU/mL.

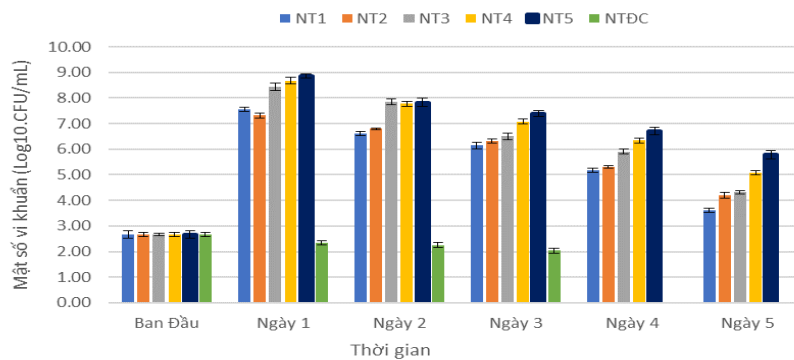


**Hình 3.37.** Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí

Theo Anderson (1993) trong nước sạch thì tổng vi khuẩn nhỏ hơn  $10^3$  CFU/mL nếu mật độ tổng vi khuẩn vượt  $10^7$  CFU/mL sẽ có hại cho tôm cá nuôi và môi trường trở nên bẩn. Tuy nhiên theo thí nghiệm này thì môi trường nước không có hoạt động của tôm, chỉ kiểm soát mật độ vi khuẩn theo từng ngày để đánh giá sự hiện diện của chúng và cũng không so sánh giữa các nghiệm thức. Môi trường nước nuôi tôm này không có sự hoạt động của tôm nên sau khi hàm lượng ammonia giảm, nitrite giảm thì vi sinh vật không còn nguồn thức ăn nên mật độ cũng sẽ giảm dần theo thời gian.

### ***Vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB)***

Hình 3.38, mật độ vi khuẩn chuyển hóa ammonia trong nước ban đầu khi lấy về phòng thí nghiệm là  $4,7 \times 10^2$  CFU/mL, sau khi bổ sung hỗn hợp vi sinh theo các tỷ lệ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 % với mật độ vi khuẩn là  $10^8$  CFU/g vào các can 20L chứa nước nuôi tôm cho thấy vi khuẩn AOB tăng mật độ lên  $10^7$  CFU/mL (NT1 và NT2) và  $2,8 - 7,2 \times 10^8$  CFU/mL (3 nghiệm thức NT3, NT4, NT5). Đến ngày thứ 2 vi sinh bắt đầu hoạt động sử dụng ammonia như nguồn thức ăn và chuyển hóa thành nitrite, nitrate. Tuy nhiên hàm lượng vi sinh vật giảm nhanh trong thời gian 4 - 5 ngày sau khi cho vào môi trường nước nuôi tôm. Đến ngày thứ 4 thì ở NTĐC nhóm vi khuẩn AOB không còn phát hiện và nghiệm thức NT1, NT2, NT3 là  $1,5 - 8,1 \times 10^5$  CFU/mL, NT4, NT5 là  $2,2 - 5,2 \times 10^6$  CFU/mL. Đến ngày thứ 5 mật độ tiếp tục giảm nhiều, nghiệm thức NT1 là  $4,1 \times 10^3$  CFU/mL, NT2, NT3 là  $1,6 - 2,1 \times 10^4$  CFU/mL và NT4, NT5 là  $1,2 - 6,2 \times 10^5$  CFU/mL.



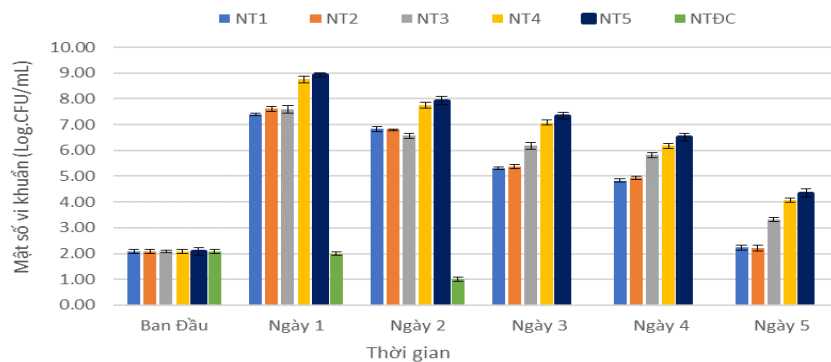
**Hình 3.38.** Mật độ vi khuẩn chuyển hóa ammonia

Hàm lượng vi sinh vật chuyển hóa ammonia giảm nhanh theo từng ngày, ngày đầu tiên vi khuẩn AOB được bổ sung vào môi trường nước, vi sinh vật sử dụng ammonia làm thức ăn để sinh trưởng và phát triển, chuyển hóa  $\text{NH}_4^+$  thành  $\text{NO}_2^-$  và đây là môi trường nước không nuôi tôm nên thức ăn không được cung cấp vào, do đó một phần các vi sinh vật cạnh tranh dinh dưỡng lẫn nhau, làm ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn và một phần nhóm vi khuẩn không sinh bào tử chết đi cũng làm ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn.

- ***Vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB)***

Vi khuẩn chuyển hóa nitrite trong nước ban đầu khi lấy về phòng thí nghiệm

có mật độ từ  $1,2 \times 10^2$  CFU/mL, sau khi bổ sung hỗn hợp vi sinh theo các tỷ lệ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 % với mật độ vi khuẩn là  $10^8$  CFU/g vào các can 20L chứa nước nuôi tôm cho thấy vi khuẩn NOB tăng mật độ lên  $2,5 - 4,1 \times 10^7$  CFU/mL cho 3 nghiệm thức NT1, NT2, NT3 và mật độ  $5,6 - 8,3 \cdot 10^8$  CFU/g ở NT4, NT5. Đến ngày thứ 2 vi sinh bắt đầu hoạt động sử dụng nitrite để chuyển hóa thành nitrate thì mật độ có giảm nhẹ ở NT4, NT5 còn  $5,5 - 8,5 \times 10^7$  CFU/mL và nghiệm thức NT1, NT2, NT3 giảm xuống còn  $3,7 - 6,7 \times 10^7$  CFU/mL. Tuy nhiên hàm lượng vi sinh vật giảm nhanh trong thời gian 3, 4, 5 ngày sau khi cho vào môi trường nước nuôi tôm. Đến ngày thứ 3 thì ở NTĐC nhóm vi khuẩn NOB không còn phát hiện và các nghiệm thức giảm mật độ rất nhanh. Đến ngày thứ 5 mật độ giảm khá thấp, mật độ vi sinh NOB ở nghiệm thức NT1, NT2 còn  $1,6 - 1,7 \times 10^2$  CFU/mL, NT3 là  $2,1 \times 10^3$  CFU/mL, NT4, NT5 là  $1,2 - 2,2 \times 10^4$  CFU/mL.



**Hình 3.39.** Mật độ vi khuẩn chuyển hóa nitrite

Tương tự như nhóm vi khuẩn AOB, mật độ vi khuẩn giảm khá nhanh do hàm lượng nitrite bị chuyển hóa hết và vi khuẩn không còn thức ăn sử dụng tồn tại và phát triển. Trong nhóm vi khuẩn bổ sung chỉ có vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 là sinh bào tử, còn hai chủng vi khuẩn còn lại không sinh bào tử nên vi khuẩn bị chết đi 1 phần. Tóm lại, khi bổ sung chế phẩm hỗn hợp vi khuẩn vào trong nước nuôi tôm thẻ chân trắng (không có tôm) có chứa ammonia và nitrite thì chế phẩm sẽ hoạt động làm giảm hàm lượng ammonia, nitrite và nitrate trong nước. Mật độ nhóm vi khuẩn AOB, NOB trong môi trường nước ao thực địa mọc được trên môi trường Winogradki khoảng 102 CFU/mL và được bổ sung chế phẩm vi sinh vào là 108 CFU/mL, phân tích mật độ sau bổ sung thì mật độ vi khuẩn AOB, NOB tăng từ 108

– 109 CFU/mL. Hàm lượng vi sinh ngày đầu tiên cao do mới bổ sung vi sinh vật vào, hàm lượng dinh dưỡng trong nước vẫn còn, vi sinh vật sử dụng như là nguồn thức ăn. Đến ngày thứ 3, 4, 5 thì vi sinh vật giảm do lượng chất hữu cơ trong nước giảm, vi khuẩn không còn nguồn thức ăn để phát triển sinh khối.

Nhìn chung, qua các ngày mật độ vi khuẩn ở tất cả các NT đều có xu hướng giảm, giảm khá nhanh. Sau 5 ngày mật độ vi sinh dao động về khoảng  $10^2 - 10^4$  (CFU/mL), có thể đây là do lượng  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  giảm (dinh dưỡng giảm) làm tăng lượng  $\text{NO}_2^-$ , sau đó  $\text{NO}_2^-$  giảm để tạo ra  $\text{NO}_3^-$  và tiếp tục  $\text{NO}_3^-$  giảm, chuyển thành  $\text{N}_2$  phân tử nên môi trường nước nuôi tôm thẻ chân trắng (không có tôm) để thời gian lâu thì khả năng sống sót của nhóm vi khuẩn bản địa cũng như nhóm vi khuẩn nitrite hóa bổ sung sẽ giảm đi rất nhiều. Để đánh giá đầy đủ hơn hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản, cần thực hiện thí nghiệm quy mô hơn và toàn diện hơn, vì thế, tiếp tục tiến hành đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh lên chất lượng nước nuôi tôm thẻ chân trắng, giai đoạn ương giống ở qui mô  $1\text{m}^3$  với 3 tỷ lệ vi sinh là 0,3%, 0,4% và 0,5%.

### **3.3.2. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong bể nuôi tôm thẻ chân trắng giai đoạn ương giống ở qui mô bể xi-măng $1\text{m}^3$ .**

#### ***Các chỉ tiêu môi trường ương nuôi ấu trùng tôm thẻ chân trắng***

Trong suốt thời gian thực hiện thí nghiệm, các chỉ tiêu nhiệt độ, pH, DO được đo định kỳ một ngày 2 lần (bảng kết quả phần phụ lục 3.2 – bảng 3.8 và 3.9). Nhiệt độ nước của các nghiệm thức tương đối ổn định trong quá trình thí nghiệm. Vào buổi sáng, nhiệt độ cao nhất ở NT1 ( $28,06 \pm 0,96$  °C), thấp nhất ở NTĐC ( $27,96 \pm 0,94$  °C). Vào buổi chiều nhiệt độ nước cao hơn so với buổi sáng và cao nhất ở NTĐC ( $29,37 \pm 1,24$  °C), thấp nhất ở NT3 ( $29,19 \pm 1,15$  °C), tuy nhiên sự khác biệt giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Theo Wyk và Scarpa (1999) thân nhiệt của tôm sẽ thường xuyên ở trạng thái cân bằng với nhiệt độ của nước. Khoảng nhiệt độ tối ưu cho tôm chân trắng trưởng thành là từ 28 đến 32°C (Boyd, 1998; Wyk và Scarpa, 1999). Vì vậy, nhiệt độ ở các nghiệm thức thí nghiệm nằm trong khoảng thích hợp cho sự tăng trưởng của tôm, và cũng phù hợp với sự phát triển của vi khuẩn (theo nội dung 2, vi khuẩn tăng sinh tốt ở nhiệt độ 30°C).



Theo Lawson (1995) pH là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng nước ao nuôi, đặc biệt là trong ương ấu trùng tôm chân trắng. Khi pH biến động thì sẽ ảnh hưởng tới quá trình sinh lý, sinh hóa trong cơ thể tôm, làm ảnh hưởng các yếu tố khác trong ao như tảo, khí độc. pH trung bình của các nghiệm thức luôn luôn ổn định, vào buổi sáng từ 7,72 – 7,78 và buổi chiều từ 7,61 – 7,76, các khoảng dao động này nằm trong giới hạn thích hợp cho tôm (Boyd và ctv, 2002; Whetstone và ctv, 2002) và thích hợp cho vi khuẩn hoạt động (Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 2002).

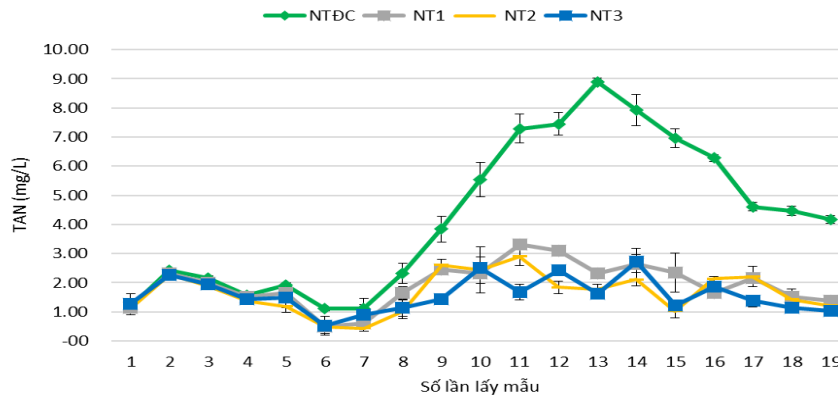
Theo Wanninayate và ctv (2001) nghiên cứu sự phân phối ôxy trong ao cho thấy có 70% lượng ôxy tiêu hao cho sinh vật đáy và sự ôxy hóa các hợp chất hữu cơ, chỉ có 20% lượng ôxy tiêu tốn cho quá trình hô hấp của tôm. Hàm lượng DO trung bình của các nghiệm thức ở cả hai buổi sáng và chiều tương đối ổn định, có sự khác nhau giữa các nghiệm thức nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ), dao động trung bình từ 6,5 – 6,97 ppm khoảng biến động này nằm trong giới hạn từ 6 – 8,2 ppm, theo nghiên cứu của Avnimelech (2007) là thích hợp cho tôm. Hàm lượng DO như vậy rất thuận lợi cho tôm tăng trưởng và phát triển, cũng như duy trì được sự phát triển tốt của lượng tảo trong hệ thống. Ngoài ra, DO cũng hỗ trợ cho nhóm vi khuẩn hiếu khí chuyển hóa các hợp chất N trong ao hoạt động tốt hơn thì việc chuyển hóa các khí độc trong ao cũng nhanh hơn.

Độ kiềm cao nhất ở NT2 ( $121,25 \pm 18,45$  mg/L) và thấp nhất ở NTĐC ( $106,75 \pm 31,74$  mg/L), giữa các nghiệm thức có sự sai khác về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ). Theo Hargreaves (2013), độ kiềm trong ao nuôi nên duy trì ở mức 100 – 150 mg/L. Do đó, độ kiềm trung bình ở các nghiệm thức nằm trong mức cho phép và không gây hại đến tôm. Độ mặn trong thí nghiệm không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ), các nghiệm thức duy trì được độ mặn 20‰. Theo Samocha (2019) độ mặn 20 - 35 ‰ sẽ thích hợp cho tôm chân trắng phát triển. vì vậy độ mặn trong các nghiệm thức ổn định, phù hợp để tôm phát triển và cũng phù hợp với khả năng chịu mặn của vi khuẩn (trong thí nghiệm khảo sát chịu mặn, nội dung 2).

#### ***Khảo sát hàm lượng TAN trong quá trình ương nuôi***

Tôm được thả sau 2 ngày ổn định nước trong bể (lần 2 là mới bắt đầu thả

tôm), tôm được ương nuôi trong 30 ngày, đến lần thứ 17 là dừng nuôi tôm và tiếp tục lấy nước phân tích chỉ tiêu để theo dõi sau 4 ngày không có tôm (lần 18, 19), mẫu nước được lấy 2 ngày/1 lần để tiến hành phân tích (phụ lục 3.2 – bảng 3.14).

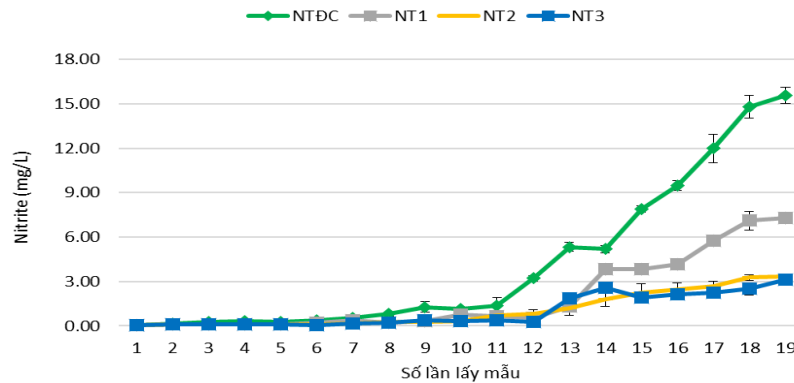


**Hình 3.40.** Hàm lượng TAN của các nghiệm thức

Kết quả phân tích ở Hình 3.40 cho thấy hàm lượng TAN ở NTĐC biến thiên từ 1,18 – 8,89 mg/L, hàm lượng TAN tương đối ổn định ban đầu từ lần 1 đến lần 7, đến lần 8 thì hàm lượng TAN trong bể đối chứng bắt đầu có sự biến động và chênh lệch lớn ở các lần đo, đặc biệt ở lần 13 tăng lên cao nhất và giảm dần ở các lần sau, nguyên nhân của sự biến động TAN trong nghiệm thức đối chứng này có thể do “tảo trong ao thường bị tàn do cường độ ánh sáng quá cao hoặc vì một số nguyên nhân khác. Các sự cố này khiến cho môi trường ao nuôi thủy sản mất ổn định, dẫn đến sự thiếu hụt oxy hòa tan hoặc gia tăng hàm lượng TAN” (Avnimelech và ctv, 1994). Trong thời gian 30 ngày, NT1 biến thiên từ 1,14 – 3,31 mg/L, NT2 từ 1,12 – 2,90 mg/L và NT3 từ 1,26 – 2,50 mg/L. Ở các nghiệm thức, TAN khá ổn định, tăng cao nhất là lần thứ 9 đến lần thứ 15 tuy nhiên không có NT nào có hàm lượng TAN tăng vượt 3,5 mg/L, hàm lượng TAN giảm nhẹ ở lần 18, 19. Theo Boyd (1998); Chanratchakool (2003), hàm lượng TAN thích hợp cho ao nuôi tôm là 0,2 – 2,0 mg/L và hàm lượng ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) phải nhỏ hơn 0,1mg/L. Tuy nhiên theo Robertson (2006); Samocha (2019) thì hàm lượng TAN nhỏ hơn 3,0 mg/L là khoảng tối ưu cho tôm nuôi phát triển và độ độc của nó tùy thuộc vào pH. Kết quả của nghiên cứu cho thấy TAN của NT2, NT3 nằm trong ngưỡng cho phép tôm phát triển, chứng tỏ hàm lượng vi sinh được bổ sung đủ trong ao nuôi tôm góp phần phân hủy vật chất hữu cơ chứa nitơ thành các hợp chất  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ . Do đó,

cho thấy tỷ lệ vi sinh là 0,4 % và 0,5% là tỷ lệ tốt nhất để bổ sung cho bể nuôi tôm thẻ chân trắng giai đoạn ương giống.

### **Khảo sát hàm lượng nitrite trong quá trình ương nuôi**

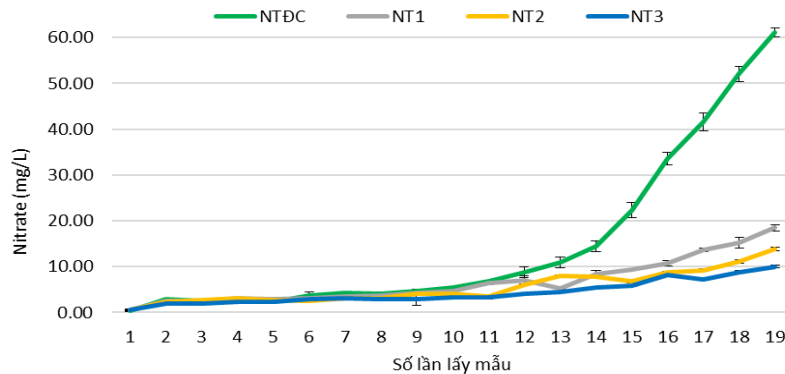


**Hình 3.41.** Hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  của các nghiệm thức

Hình 3.41 hàm lượng nitrite ổn định từ bắt đầu thả tôm đến thời điểm ương nuôi được 20 ngày (lần thứ 1 – 12), càng về sau hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  càng tăng dần từ lần thứ 12 đến thời điểm thu tôm là lần thứ 17, khoảng biến thiên hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  của NTĐC từ 0,06 – 15,58 mg/L, NT1 từ 0,07 – 7,32 mg/L, NT2 từ 0,04 – 3,32 mg/L và NT3 từ 0,05 – 3,10 mg/mL (phụ lục 3.2 – bảng 3.15). Hàm lượng nitrite tăng cao và biến động mạnh ở lần thu mẫu thứ 12 – lần thứ 19 ở nghiệm thức đối chứng. Ở các nghiệm thức còn lại thì hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  cũng tăng ở lần thu mẫu 12 nhưng không biến động mạnh như NTĐC. Theo Boyd (1998) hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  cho phép trong ao nuôi thủy sản là không vượt quá 10 mg/L và tốt nhất là nhỏ hơn 2 mg/L. Theo Alcaraz và ctv (1999), hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  gây chết 50% tôm trong 48 giờ là 240 mg/L. Whetstone và ctv. (2002) nồng độ  $\text{N-NO}_2^-$  trong ao nuôi tôm phải nhỏ hơn 0,23 mg/L được xem là an toàn. Theo kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  của NT1, NT2, NT3 nằm trong phạm vi cho phép để tôm phát triển và không gây bất lợi đến sức khỏe của tôm, chỉ riêng NTĐC ở thời điểm 20 ngày nuôi thì hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  vượt trội lên so với ngưỡng cho phép hàm lượng nitrite trong ao. Điều này cho thấy ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh rất có ý nghĩa đến hàm lượng nitrite, nghiệm thức bổ sung chế phẩm vi sinh càng cao thì hàm lượng nitrite lại càng thấp và ít biến động trong quá trình nuôi tôm.

### **Khảo sát hàm lượng nitrate trong quá trình ương nuôi**

Hình 3.42 hàm lượng Nitrate ổn định từ bắt đầu thả tôm đến thời điểm ương nuôi được 22 ngày (lần thứ 1 – 13), càng về sau hàm lượng  $\text{NO}_3^-$  càng tăng dần từ lần thứ 13 đến thời điểm thu tôm là lần thứ 17, khoảng biến thiên  $\text{NO}_3^-$  trong NTĐC từ 0,44 - 61,11 mg/L, NT1 là 0,56 – 18,51 mg/L, NT2 là 0,56 – 13,86 mg/L, NT3 từ 0,50 – 10,03 mg/L, giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ) (phụ lục 3.2 – bảng 3.16).



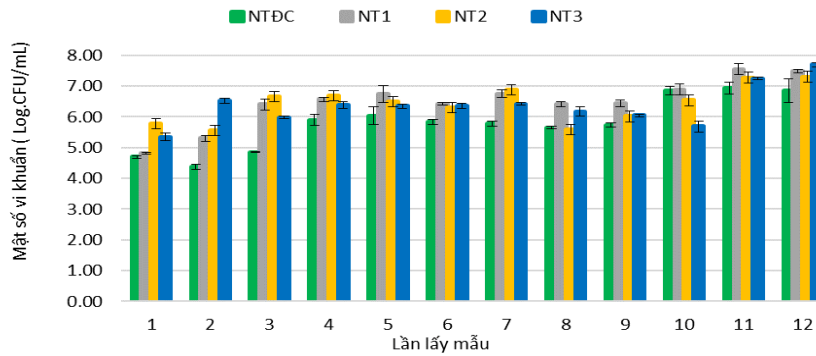
**Hình 3.42.** Hàm lượng  $\text{NO}_3^-$  của các nghiệm thức

Hàm lượng nitrate trong nghiên cứu này vẫn nằm trong ngưỡng thích nghi của tôm thẻ chân trắng. So với NTĐC, các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn có hàm lượng nitrate ổn định hơn và hầu như không tăng cao trong suốt quá trình ương nuôi tôm, điều này cho thấy nhóm vi khuẩn bổ sung có khả năng chuyển hóa nitrate trong hệ thống ương nuôi tôm, giúp cho hàm lượng nitrate luôn ổn định trong quá trình ương giống tôm thẻ chân trắng. Theo Zweig và ctv. (1999) nitrate là sản phẩm cuối cùng của quá trình nitrate hóa và nồng độ thường cao hơn cả ammonia và nitrit nhưng ít độc hơn nhưng nồng độ nitrate cao cũng có thể dẫn đến hiện tượng phú dưỡng và phát triển quá mức của tảo và thực vật thủy sinh, có thể có tác động tiêu cực đến các loài thủy sản nuôi. Theo Boyd (1998) cho rằng nồng độ nitrate 0,2 – 10,0 mg/L là thích hợp cho ao nuôi thủy sản. Theo tác giả Wyk và Scarpa (1999) thì hàm lượng nitrate phù hợp trong ao nuôi thủy sản nhỏ hơn 60 mg/L.

#### ***Tổng vi khuẩn hiếu khí trong bể ương nuôi ấu trùng tôm thẻ chân trắng***

Hình 3.43 cho thấy các nghiệm thức có bổ sung chế phẩm vi khuẩn thì tổng vi khuẩn hiếu khí cao hơn so với NTĐC, mật độ vi khuẩn dao động trong các nghiệm thức biến thiên từ  $10^4$  CFU/mL đến  $10^7$  CFU/mL trong 12 lần thu mẫu (mật

độ vi khuẩn được đếm 3 ngày/1 lần), mật độ vi khuẩn hiếu khí tăng dần theo thời gian thí nghiệm và cao nhất ở NT3 ( $4,96 \times 10^7$  CFU/mL), nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn, mật độ vi khuẩn hiếu khí từ  $10^4$  -  $10^6$  CFU/mL, thấp nhất trong các nghiệm thức.



**Hình 3.43.** Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí trong các nghiệm thức

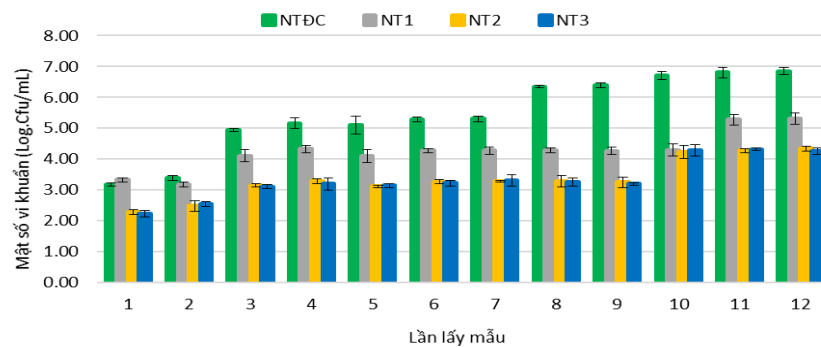
Nghiệm thức NT2 và NT3 cho mật độ vi khuẩn cao nhất trong thí nghiệm dao động từ  $10^5$  –  $10^7$  CFU/mL trong 30 ngày và mật độ giữa hai nghiệm thức không có sự khác biệt nhiều, tỷ lệ chế phẩm vi sinh được bổ sung vào bể ban đầu càng nhiều thì cho mật độ vi khuẩn hiếu khí cao nhất. Trong nghiên cứu này, NT3 có tỷ lệ chế phẩm vi sinh là 0,5% cho mật độ vi khuẩn hiếu khí cao nhất, do đó việc chuyển hóa ammonia, nitrite, nitrate cũng nhiều nhất và ổn định.

Trong thí nghiệm, chế phẩm vi sinh là chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>. Theo Verschuere và ctv (2000) vi khuẩn *Bacillus* sp. đóng vai trò quan trọng trong việc cải thiện chất lượng nước và cạnh tranh với các vi khuẩn có hại trong môi trường nước. *Bacillus* sp. đạt hiệu quả cao trong việc chuyển đổi vật chất hữu cơ thành CO<sub>2</sub>. Bên cạnh đó, nhóm vi khuẩn *Bacillus* cũng có khả năng phân hủy protein rất hiệu quả, chúng phân hủy thành các hợp chất nhỏ hơn như là các acid amin (Aslim và ctv., 2002). *Bacillus licheniformis* là chủng vi khuẩn được sử dụng rộng rãi trong sản xuất probiotic phục vụ nuôi trồng thủy sản (Decamp và ctv, 2004). Ngoài ra, chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri*, *Rhodococcus rhodochrous* cũng được ứng dụng khá nhiều trong nuôi trồng thủy sản, vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* loại bỏ N trong nước ao cá tra nhiễm ammonium cao (Cao Ngoc Diep và ctv, 2009), chủng vi

khuẩn *Rhodococcus sp.* được sử dụng trong thủy sản như là probiotic và bổ sung carotenoid cho động vật thủy sinh (Ponce-Granillo CV và ctv, 2016). Vì vậy duy trì mật độ vi khuẩn hiếu khí này trong ao có thể giảm sự tích lũy vật chất hữu cơ và các chất thải hòa tan trong nước. Vì vậy, trong môi trường nuôi tôm thẻ chân trắng có bổ sung chế phẩm vi sinh thì có khả năng xử lý khí độc sẽ tốt hơn so với nghiệm thức không bổ sung chế phẩm vi sinh.

### **Mật số vi khuẩn *Vibrio sp.* trong bể ương nuôi ấu trùng tôm thẻ chân trắng**

Một trong những yếu tố hạn chế chính trong sự phát triển của ngành tôm là sự hiện diện của nhóm vi khuẩn gây bệnh *Vibrio*. Theo nghiên cứu của tác giả Nguyễn Công Tráng và ctv (2019), *Vibrio parahaemolyticus* phân lập được từ các hệ thống nuôi tôm thẻ chân trắng ở Bạc Liêu có tỷ lệ kháng cao nhất với Apramycin (73,3%) và nhạy cao nhất (100%) với Doxycycline và Chloramphenicol. Việc sử dụng chế phẩm vi khuẩn để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn *vibrio sp.* được ứng dụng khá nhiều hiện nay và có nhiều kết quả rất triển vọng, giúp các sản phẩm thủy sản được an toàn, không gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người đang được quan tâm (Moriarty và ctv, 1997; Verschuere và ctv, 2000).



**Hình 3.44.** Mật độ tổng vi khuẩn *Vibrio* trong các nghiệm thức

Kết quả thí nghiệm ở Hình 3.44 cho thấy mật độ vi khuẩn *Vibrio spp.* trong nước ở NT ĐC dao động từ  $10^3 - 10^6$  CFU/mL, biến động khá nhiều trong 12 lần thu mẫu, càng về cuối thí nghiệm thì mật độ *Vibrio sp.* càng cao, do nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi sinh vật và trong quá trình cho ăn không kiểm soát được lượng thức ăn dư thừa dưới đáy bể đã tạo môi trường thuận lợi cho vi sinh vật có hại phát triển. Mật độ tổng vi khuẩn *Vibrio* của NT1 là  $10^3 - 10^5$  CFU/mL và ở

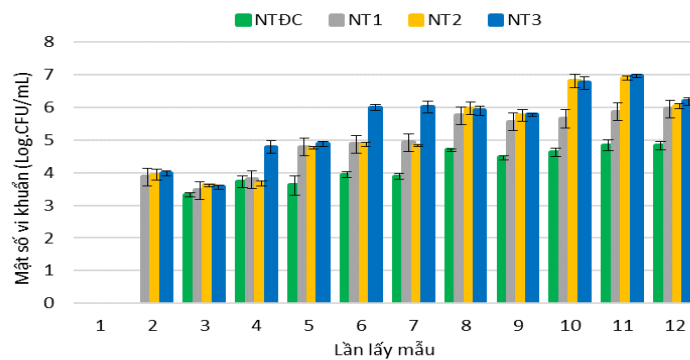
NT2 và NT3 có mật độ *Vibrio* tổng là  $10^2$ - $10^4$  CFU/mL, mật độ vi khuẩn *Vibrio* tăng theo thời gian từ đầu thí nghiệm đến cuối thí nghiệm. Mật độ vi khuẩn *Vibrio* của NT2, NT3 vẫn nằm trong giới hạn cho phép tuy nhiên 3 lần lấy mẫu cuối cùng mật độ *Vibrio* sp. tăng lên  $10^4$  CFU/mL, ở NT ĐC và NT1 mật độ *Vibrio* vượt quá giới hạn cho phép từ lần thu mẫu thứ 3 - 12. Điều này cho thấy tổng *Vibrio* trong các bể có bổ sung chế phẩm vi sinh tương đối ổn định, có thể là do các vi khuẩn cũng đã chuyển hóa các chất hữu cơ dư thừa trong bể, làm giảm dinh dưỡng trong nước nuôi, từ đó làm giảm mật số *Vibrio* sp., ngoài ra, cũng có thể chế phẩm vi sinh được bổ sung định kỳ trong suốt quá trình nuôi, nhóm vi khuẩn có lợi đã làm ảm đạm sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio* sp.

Mật độ *Vibrio* sp. tăng cao ở cuối thí nghiệm là do không thay nước nuôi suốt quá trình thí nghiệm, do thức ăn dư thừa của tôm tích lũy trong quá trình nuôi làm tạo điều kiện thuận lợi cho *Vibrio* phát triển và khi *Vibrio* tăng lên thì các vi sinh vật hiếu khí cũng tăng lên theo và tương tác qua lại. Theo Moriaty (1999) mật độ vi khuẩn *Vibrio* tổng vượt quá  $10^3$  CFU/mL gây hại đến tôm. Tác giả Lê Hồng Phước và ctv (2017) đã nghiên cứu với mẫu nước các ao nuôi ở Bạc Liêu cho thấy mật độ *Vibrio* tổng số trung bình là  $10^3$  CFU/mL, mật độ vi khuẩn *Vibrio* tổng bắt đầu tăng từ tuần nuôi thứ 3 và mật độ vi khuẩn không vượt quá  $10^4$  CFU/mL tuy nhiên, đối với ao có mật độ *Vibrio* tăng cao vào tuần thứ 3, 4 và lớn hơn  $10^4$  CFU/mL có liên quan đến biểu hiện xấu trên gan tụy tôm. Giới hạn tối ưu được xác định đối với *Vibrio* tổng trong nước ao nuôi tôm ở mức  $< 10^3$  CFU/mL (Ganesh và ctv. 2010). Võ Hồng Phượng và ctv (2018), *Bacillus licheniformis* có khả năng kháng với nhóm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh teo gan tụy cấp tính trên tôm. Vì thế, những nghiệm thức có bổ sung chế phẩm vi sinh sẽ hạn chế được sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio*. Do trong nghiên cứu này, chỉ quan tâm đến tổng số vi khuẩn *Vibrio* hiện diện trong bể ương nuôi nên không tiến hành định danh loài vi khuẩn *Vibrio*.

#### **Mật số vi khuẩn AOB chuyển hóa ammonia trong bể ương nuôi**

Phân tích nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia trong ao, kết quả ở Hình 3.45 cho thấy mật độ vi khuẩn chuyển hóa ammonia dao động từ  $7,3 \times 10^3$  CFU/mL -  $9,1 \times 10^6$  CFU/mL sau 30 ngày nuôi tôm. Riêng NT ĐC đến lần lấy mẫu thứ 3 (10 ngày

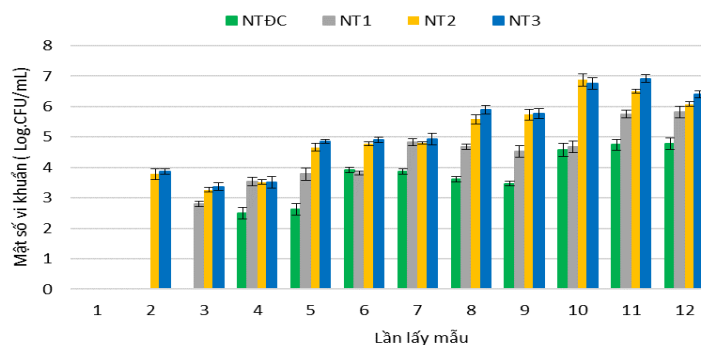
sau nuôi) vi khuẩn AOB mới xuất hiện, mật độ là  $2,1 \times 10^3$  CFU/mL. Mật độ vi khuẩn chuyển hóa ammonia biến động tăng dần đến cuối thí nghiệm, NT ĐC có mật độ vi khuẩn AOB thấp nhất so với các nghiệm thức còn lại. NT1 có mật độ vi khuẩn dao động từ  $10^3$  -  $10^5$  CFU/mL, ở NT2 và NT3 có mật độ vi khuẩn AOB từ  $10^3$  –  $10^6$  CFU/mL, mật độ giữa hai nghiệm thức NT2, NT3 hầu như không có khác biệt.



**Hình 3.45.** Mật độ vi khuẩn chuyển hóa ammonia trong các nghiệm thức

Đối với các NT có bổ sung vi sinh vật, đến ngày thứ 7 nhóm vi khuẩn AOB được tìm thấy ở tất cả các nghiệm thức và mật độ càng tăng đến cuối thí nghiệm có thể do các chủng vi khuẩn phân hủy hợp chất hữu cơ tốt hơn, sinh ra nhiều  $\text{NH}_4^+$  đã kích thích sự phát triển của nhóm vi khuẩn AOB sớm hơn so với các nghiệm thức đối chứng. Theo Rennie và Schmidt (1977) nhóm vi khuẩn nitrate hoá thường phân bố ở những nơi có nhiều hợp chất nitơ và muối vô cơ như nước thải công nghiệp, nước cống, đáy ao nhiều bùn và tại các khu vực đó mật độ của chúng có thể lên đến  $10^4$  –  $10^5$  tế bào/g bùn. Ở nghiên cứu này, cho thấy nhóm AOB ở NT2, NT3 có mật độ khá cao, có thể là do quá trình thí nghiệm, định kỳ 6 ngày bổ sung vi sinh 1 lần.

#### **Mật số vi khuẩn NOB chuyển hóa nitrite trong bể ương nuôi**



**Hình 3.46.** Mật độ vi khuẩn chuyển hóa nitrite trong các nghiệm thức



Hình 3.46 cho thấy kết quả thí nghiệm cho thấy mật độ vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB) dao động từ  $10^2$  CFU/mL –  $10^5$  CFU/mL sau 30 ngày nuôi tôm. Riêng NT ĐC đến lần lấy mẫu thứ 4 (13 ngày sau nuôi) vi khuẩn NOB mới xuất hiện, mật độ là  $3,1 \times 10^2$  CFU/mL và tăng dần đến cuối thí nghiệm là  $6 \times 10^4$  CFU/mL. Ở NT1 mật độ vi khuẩn NOB là  $10^2 - 10^5$  CFU/mL và đến ngày thứ 10 mới xuất hiện vi khuẩn chuyển hóa nitrite. Nghiệm thức NT2, NT3 có mật độ vi khuẩn NOB dao động  $10^3 - 10^6$  CFU/mL, mật độ vi khuẩn chuyển hóa nitrite có mật số  $10^6$  CFU/mL ở lần thu mẫu thứ 10, 11, 12. Có thể thời điểm gần cuối thí nghiệm, các chất hữu cơ từ thức ăn dư thừa tích tụ dưới đáy bể, vi khuẩn được bổ sung liên tục 6 ngày 1 lần và nhóm vi khuẩn nitrite quen với điều kiện hoạt động của môi trường mới, chúng hoạt động chuyển hóa  $\text{NH}_4^+$  thành  $\text{NO}_2^-$  mạnh mẽ hơn nên mật độ vi khuẩn tăng lên.

#### ***Đánh giá tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm***

Kết quả tốc độ tăng trưởng, tỷ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức có bổ sung chế phẩm vi sinh cao hơn so với NT ĐC (Bảng 3.14 - phụ lục 3.2). Các yếu tố như tỷ lệ sống của tôm, tăng trọng trung bình của tôm, tốc độ tăng trưởng của tôm tỷ lệ thuận theo tỷ lệ vi sinh bổ sung vào bể, chứng tỏ vi sinh được bổ sung nhiều đã giúp hoạt động trong hệ thống tốt hơn, giảm vi khuẩn có hại, giúp tôm phát triển.

Tác giả Far và ctv (2009) đã tổng kết một số tác giả đã chứng minh được lợi ích của việc ứng dụng vi khuẩn hữu ích trong nuôi tôm. Vai trò của các vi khuẩn này giúp cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột, dẫn đến tăng khả năng hấp thụ thức ăn và tăng tăng trọng của vật nuôi (Fuller, 1998; Rengpipat và ctv, 1998). Nhiều nghiên cứu cho thấy số lượng vi khuẩn hữu ích là nhân tố duy nhất thúc đẩy làm tăng tăng trọng và tỉ lệ sống của tôm nuôi (Zhou và ctv, 2009). Chế phẩm sinh học nitrate hóa nghiên cứu đã đạt hiệu quả chuyển hóa ammonia trên 95% trong hệ lọc ở điều kiện phòng thí nghiệm. Chế phẩm này còn được ứng dụng thành công tại các đầm, ao nuôi trồng thủy sản của các tỉnh Thanh Hóa và Sóc Trăng, hàm lượng ammonia tổng (TAN) luôn luôn thấp hơn 0,1 mg/L khi sử dụng chế phẩm nitrate hóa nghiên cứu (Hoàng Phương Hà và ctv, 2017). Tác giả Xue Li và ctv (2021) đã khảo sát hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus megaterium* và *Bacillus subtilis* với mật số  $6 \times 10^5$  CFU/g, xử

lý ammonia, nitrite, nitrate trong hệ thống nuôi cá chép trong thời gian 15 ngày, cho thấy hiệu suất chuyển hóa ammonia là 46,3%, nitrite là 76,3% và nitrate 35,5%. Theo tác giả Võ Văn Nha và ctv (2021), cho thấy việc dùng liều lượng 5ppm chế phẩm vi sinh, tần suất 7 ngày/lần, trong 3 lần là có thể xử lý được nước thải từ ao nuôi thâm canh tôm thẻ chân trắng ở ao trên cát.

Qua các kết quả trên cho thấy khi bổ sung chế phẩm vi sinh vào bể nuôi tôm thẻ chân trắng, thì hàm lượng  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  đều được kiểm soát tốt, mật độ vi khuẩn *Vibrio* cũng được hạn chế từ đó giúp tôm tăng trưởng và phát triển tốt hơn, giúp tỷ lệ chết giảm. Trong nghiên cứu này, đề xuất tỷ lệ chế phẩm vi khuẩn bổ sung là 0,4% hay 0,5% có mật độ  $10^8$  CFU/g vào bể nuôi tôm thẻ chân trắng định kỳ 6 ngày/1 lần có thể hạn chế, làm giảm hàm lượng  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  trong bể.

Sản phẩm đạt được trong luận án là phân lập và tuyển chọn được ba chủng vi khuẩn là *Bacillus licheniformis* B85, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>, vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* KL15 từ nền đáy vùng nuôi tôm hùm có khả năng chuyển hóa ammonia, nitrite tốt nhất, các chủng vi khuẩn trên là chủng vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng, có nguồn gốc tự nhiên trong môi trường nước biển, tham gia vào chu trình chuyển hóa các hợp chất N để xử lý các chất thải dư thừa trong nền đáy khu vực nuôi tôm hùm. Các nghiên cứu trong nước từ trước đến nay luôn quan tâm và tuyển chọn nhóm vi khuẩn nitrite hóa tự dưỡng vì chúng chuyển hóa ammonia, nitrite khá tốt trong chu trình N (Rajta, 2019) nhưng trong nghiên cứu này lại tuyển chọn được các chủng vi khuẩn dị dưỡng sống ở nền đáy của Vịnh Xuân Đài, chịu được độ mặn cao. Tác giả Rajta, (2019) đã cho thấy vai trò của nhóm vi khuẩn dị dưỡng trong việc chuyển hóa ammonia, nitrite, nitrate, đặc biệt là nhóm vi khuẩn *Bacillus*, *Pseudomonas*. Ngoài ra, tác giả cũng cho rằng những nhóm vi khuẩn dị dưỡng có thể chuyển hóa ammonia, nitrite và nitrate trong nước thải có chứa nhiều kim loại nặng và nước có nồng độ muối NaCl cao. Điều này, chứng tỏ trong chu trình chuyển hóa nitơ bên cạnh các chủng vi khuẩn nitrate hóa tự dưỡng vẫn có sự tồn tại song song của nhóm vi khuẩn nitrate dị dưỡng. Theo tác giả Nguyễn Lâm Dũng và ctv (2002), vi sinh vật dị dưỡng sử dụng nguồn thức ăn cacbon để làm nguồn dinh dưỡng và nguồn năng lượng. Bên cạnh đó, để vi khuẩn dị dưỡng phát triển nhanh và mạnh thì chúng phải đồng thời sử dụng nguồn cacbon, nitơ và

nguyên tố khoáng để làm thức ăn, tuy nhiên nhu cầu thức ăn để sinh trưởng của từng nhóm vi khuẩn không giống nhau. Vì thế, trong nghiên cứu này đã áp dụng đặc tính trên của vi khuẩn dị dưỡng để bước đầu tạo ra chế phẩm vi sinh chuyển hóa ammonia, nitrite dạng lỏng và dạng bột. Luận án đã khảo sát các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật, tối ưu hóa các thành phần môi trường lỏng để tạo chế phẩm vi sinh dạng lỏng và khảo sát các yếu tố để tạo chế phẩm vi sinh dạng bột.

Tác giả Nguyễn Lâm Dũng và ctv (2002), đã cho thấy nguồn nitơ mà vi sinh dễ hấp thụ nhất là  $\text{NH}_3$  và  $\text{NH}_4^+$  và chuyển hóa thành nitrite, nitrate trong chu trình N, chính vì đặc tính đó, nghiên cứu đã áp dụng chế phẩm vi sinh vào chuyển hóa các hợp chất N để ứng dụng trong nước nuôi trồng thủy sản. Luận án đã đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh trên mô hình bể nuôi ương giống tôm thẻ chân trắng ở giai đoạn post 5, cho thấy khi bổ sung chế phẩm theo định kỳ 6 ngày/1 lần, hàm lượng ammonia, nitrite, nitrate đều được kiểm soát tốt. Hiện nay, tôm hùm là loại thủy sản có giá trị kinh tế cao, được nuôi trong các lồng bè ngoài vùng nước vịnh có độ mặn cao, con giống tự nhiên và sử dụng thức ăn tươi nên việc xử lý môi trường nước rất khó khăn và hoàn toàn phụ thuộc vào sức tải của thủy vực (Tổng cục thủy sản, 2015). Ngoài ra, theo báo cáo quy hoạch nuôi tôm hùm của Tổng cục thủy sản (2015), định hướng cho phát triển từ năm 2020 - 2030, thì việc nuôi tôm hùm đang được nghiên cứu nuôi trong bể hay ao trên bờ, chuyển đổi thức ăn tươi thành thức ăn công nghiệp và ứng dụng chế phẩm vi sinh trong quá trình nuôi tôm hùm nhằm xử lý môi trường nước. Do đó, việc nghiên cứu bổ sung chế phẩm vi sinh cho môi trường nuôi tôm thẻ chân trắng trong bể qui mô  $1\text{m}^3$  ở giai đoạn ương giống post 5 nhằm đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh xử lý môi trường nuôi nước lợ và còn làm tiền đề cho việc nghiên cứu ứng dụng chế phẩm vi sinh xử lý N cho môi trường nước nuôi tôm hùm ở bể trong tương lai.

Vậy luận án đã góp phần tuyển chọn và chế tạo chế phẩm vi sinh từ nhóm vi khuẩn dị dưỡng có nguồn gốc từ môi trường nuôi tôm hùm ở biển, độ mặn 30-35 ppt có khả năng chuyển hóa được các hợp chất N tốt trong môi trường nuôi tôm thẻ chân trắng ở bể, định hướng cho việc ứng dụng chế phẩm vi sinh xử lý các hợp chất ammonia, nitrite, nitrate cho môi trường bể nuôi tôm hùm trong tương lai.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 1. Kết luận

- Phân lập, chọn lọc được 3 chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> có khả năng chuyển hóa ammonia, nitrite như sau: (1) *Bacillus licheniformis* B85 có hiệu suất chuyển hóa ammonia 98,8% trong thời gian 24 giờ, chuyển hóa nitrite 96,97% và nitrate 89,63% trong 4 ngày; (2) *Pseudomonas stutzeri* KL15 có hiệu suất chuyển hóa ammonia 83,87% trong 7 ngày, chuyển hóa nitrite 99,06% và nitrate 98,02 % trong 4 ngày; (3) *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> có hiệu suất chuyển hóa ammonia 86,21 % trong thời gian 5 ngày, chuyển hóa nitrite 95,01 % trong 3 ngày, chuyển hóa nitrate 81,24 % trong 4 ngày.

- Xác định được qui trình phân lập cho từng chủng vi khuẩn ở nền đáy vùng nuôi tôm hùm. Mỗi qui trình có sự khác nhau ở môi trường, điều kiện phân lập và môi trường tăng sinh.

- Tối ưu hóa được thành phần môi trường nhân sinh khối dạng lỏng cho 3 chủng vi khuẩn để sản xuất chế phẩm vi sinh lỏng: (1) Mật độ vi khuẩn *B.licheniformis* B85 là  $3,14 \times 10^{11}$  CFU/mL với thành phần môi trường gồm 3,94 g/L mật rỉ đường, 15,56 g/L cao nấm men và 1,13 g/L NaCl; (2) Mật độ vi khuẩn *P.stutzeri* KL15 là  $2,37 \times 10^{11}$  CFU/mL với thành phần môi trường gồm 4,95 g/L mật rỉ đường, 19,08 g/L cao nấm men và 1,13 g/L MgSO<sub>4</sub>; (3) Mật độ vi khuẩn *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> là  $2,52 \times 10^{10}$  CFU/mL với thành phần môi trường là 7,93 g/L glucose, 6,1 g/L pepton và 2,95 g/L NaCl.

- Xác định được các yếu tố như chất mang, tỷ lệ giống, độ ẩm và thời gian ảnh hưởng đến quá trình tạo sinh khối bán rắn của 3 chủng vi khuẩn để sản xuất chế phẩm vi sinh dạng bột: (1) *Bacillus licheniformis* B85: chất mang là bã đậu nành, tỷ lệ giống 5%, độ ẩm 55% và thời gian lên men là 60 giờ; (2) *Pseudomonas stutzeri* KL15: cám bắp, tỷ lệ giống 7,5%, độ ẩm 55% và thời gian lên men là 72

giờ; (3) *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> cám gạo, tỷ lệ giống 5%, độ ẩm 55% và thời gian lên men là 72 giờ.

- Chế phẩm vi sinh có chứa 3 chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> có khả năng chuyển hóa ammonia, nitrite trong môi trường nước ương ấu trùng tôm thẻ chân trắng (post 5) ở mật độ 10<sup>8</sup> CFU/gam, định kỳ 6 ngày/1 lần.

## 2. Đề nghị

Nghiên cứu đa dạng di truyền của các nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia, nitrite trong nền đáy vùng nuôi tôm hùm.

Nghiên cứu thêm các điều kiện, tối ưu hóa môi trường bán rắn để sản xuất chế phẩm vi sinh ở qui mô lớn.

Đánh giá khả năng đối kháng lẫn nhau của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> được phối trộn để sản xuất chế phẩm vi sinh ở qui mô lớn.

Đánh giá hiệu quả xử lý môi trường nước của chế phẩm vi sinh từ 3 chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> ở ao nuôi thực tế tôm thẻ chân trắng, bể hay ao nuôi tôm hùm hoặc các đối tượng thủy sản nuôi trong môi trường nước mặn, lợ khác.

Nghiên cứu so sánh hiệu quả sử dụng của chế phẩm vi sinh từ 3 chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85, *Pseudomonas stutzeri* KL15, *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub> với các sản phẩm xử lý môi trường nước nuôi tôm nước lợ trên thị trường.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Rajta, R. Bhatia , H. Setia and P. Pathania, 2019. Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater, *Journal of Applied Microbiology* 128: 1261-1278.
2. Abdollahi-Arpanahi D., et al., 2018. Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immuno-physiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 496: 43-49.
3. Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., Espinoza, V. and Vanegas, C. 1999. Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to White Shrimp *Penaeus setiferus* Postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 90–97.
4. Aleem, M.I.H and M. Alexander, 1960. *Nutrition and Physiology of Nitrobacter agilis*. Laboratory of Soil Microbiology, Department of Agronomy, Cornell University, Ithaca, New York.
5. Ana M.Vidakovic, Olja Lj. Sovljanski, Aleksandra S. Ranitovic, Dragoljub D. Cvetkovi and Sinisa L. Markov, 2017. Determination of culture medium composition for maximizing the biomass production of *Pseudomonas stutzeri*. *Acta Periodica Technologica* 48: 295 - 305.
6. Anderson, I., 1993. The veterinary approach to marine prawns. In: *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine* (Editor Brown L.): 271-296.
7. APHA, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*. 22<sup>nd</sup> edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
8. Aslim, B., N. Saglam and Y. Beyatli, 2002. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Tur. J. Bio*, 26: 41-48.
9. Avnimelech Y, 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264:140–147.
10. Avnimelech Y, Kochva M, Diab S, 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Isr J Aquac Bamidgeh* 46:119–131

11. Aykac, Kubra, Ozsurekci, Yasemin, Tuncer, Ozlem, Sancak, Banu, Cengiz, Ali Bulent, Kara, Ates, Ceyhan and Mehmet, 2016. Six cases during 2012–2015 and literature review of *Chryseobacterium indologenes* infections in pediatric patients. *Canadian Journal of Microbiology*. 62 (10): 812–819.
12. Belser, L.W. and E.L. Schmidt, 1981. Inhibitory Effect of Nitrapyrin on Three Genera of Ammonia-Oxidizing Nitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol*, 41(3): 819-821.
13. Bin Li, Ran Lv, Ying Xiao, Wei Hu, Yuliang Mai, Jingwen Zhang, Lan Lin and Xiaoyong Hu, 2019. A novel nitrite-base aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter* sp. YT03 and its transcriptome analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1-13
14. Bin Zhao, Yi Liang He, Jue Huang, Shauna Taylor, Joseph Hughes, 2010. Heterotrophic nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37:609–616.
15. Bock, E. and H.P. Koops, 1992. The genus *Nitrobacter* and related genera. In Balows HG, Truper HG, Dsorkin M, Harder W and Schleifer KH. *The prokaryotes*, 2nd edn, vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New York: 2302–2309
16. Bollmann, A., M.J. José, B. Gilissen and J.L. Hendrikus, 2002. Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 68: 4751–4757.
17. Boon, N., W. De. Windt, W. Vertraete and E.M. Top, 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) with group-specific 16 S rRNA primer for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol*, 39: 101-112.
18. Boyd C.E, Bartholomew W. Green, 2002. *Coastal Water Quality Monitoring in Shrimp Areas: An Example from Honduras*. Report of the World Bank, NACA, WWF và FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work progress for Public Discussion. 29 pages.
19. Boyd E B., 1998. Water Quality for Pond Aquaculture. *Research and*

- Development Series No.3. International Center for Aquaculture Fisheries Management 24:789-811.*
20. Bùi Hồng Long. 2001. *Đánh giá, dự báo ảnh hưởng các hoạt động kinh tế-xã hội đến điều kiện sinh thái môi trường đầm Cù Mông và vịnh Xuân Đài (Phú Yên), đề xuất các phương án quản lý và khai thác, sử dụng hợp lý.* Báo cáo tổng kết đề tài cấp trung tâm KHTN&CNQG.
  21. Cao Ngoc Diep, Pham My Cam, Nguyen Hoai Vung, To Thi Lai và Nguyen Thi Xuan My, 2009. Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment. *Bioresource Technology* 100:3787-3791.
  22. Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Thị Hoàng Nam, 2012. Ứng dụng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* và *Acinetobacter lwoffii* loại bỏ amoni trong nước thải từ rác hữu cơ. *Tạp chí Khoa học*, 22b: 1-8.
  23. Castellani A, Chalmers AJ., 1919. Manual of Tropical Medicine. *New York: William Wood and Company.* pp. 934– 936.
  24. Cole J.A., 1994. Biodegradation of inorganic nitrogen compounds in “Biochemistry of microbial degradation”. *Ratledge C.kluwer Academic publishers:* 487-512.
  25. Collins, C.H., P.M. Lyne and J.M. Grange, 1989. *In Collins and Lyn’s Microbiology Methods* (ed C.H Coline, P.N. Lyne and J.M. Grange), P. 347. London, Butterworth. Microbiological Methods. Sixth edition.
  26. Chakraborty R, Woo H, Dehal P, Walker R, Zemla M, Auer M, et al. 2017. *Pseudomonas stutzeri* strain RCH2 isolated from a Hexavalent Chromium [Cr(VI)] contaminated site. *Standards in Genomic Sciences.* 12(1): 23.
  27. Chanratchakool P., 2003. Problem in *Penaeus monodon* culture in low salinity areas. *Aquacult. Asia*, 8: 54-55.
  28. Chi Guo Sang, Yao Wu Fu, Shu-Quan Guo, Jia Ju Luo and Qi Zhong Zhang, 2020. Isolation and Characterization of an Aerobic Denitrifier *Bacillus* sp. SC16 from an Intensive Aquaculture Pond. *Water*, 12: 1-14.
  29. Decamp O., Moriarty, D.J.W., Lavens, P., 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture*



*Research 39: 334–338.*

30. Deesenthum S., Leelavatcharamas V., Brookers J. D., 2007. *Effect of feeding Bacillus sp. As probiotic bacteria on growth of giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii)*. Graduate School, Khon Kaen University Kaen, Thailand 40002.
31. Degrange V., Bardin R., 1995. Detection and counting of Nitrobacter population in soil by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6): 2093-2098.
32. 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 Quân khu 7. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 61(6): 24-28.
33. Đinh Văn Ưu và ctv, 2000. *Nghiên cứu cấu trúc 3 chiều (3D) thủy nhiệt động lực học biển Đông và ứng dụng của chúng*, Báo cáo tổng kết đề tài NCKH cấp nhà nước KHCN-06-02, tài liệu lưu trữ tại Chương trình Biển KHCN-06, Hà Nội 2000.
34. Đoàn Bộ, 1997. Mô hình toán học phân bố sinh vật nổi và năng suất sinh học sơ cấp ở vùng nước trời thêm lục địa Nam Trung bộ. *Tạp chí Sinh học*, 19 (4): 35-42.
35. Đoàn Bộ, 1998. Nghiên cứu năng suất sinh học quần xã Plankton vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai bằng phương pháp mô hình toán. *Tạp chí khoa học ĐHQGHN: Tuyển tập các công trình khoa học Hội nghị Khoa học ĐHKHTN: Ngành Khí tượng - Thủy văn - Hải dương*, 1-7.
36. Đoàn Thị Tuyết Lê, Phạm Vũ Bảo, Nguyễn Ngọc Tùng, Đỗ Minh Anh, 2020. Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men rế tiền chủng *Bacillus subtilis* LH1 bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm phục vụ sản xuất Probiotic. *Tạp chí Khoa học Lạc Hồng*, (9): 37- 40.
37. Ehrlich, G. G., 1975. Water quality: *Analytical Methods - "Nitrifying bacteria (most probable number, MPN, method)"* in: quality of water branch technical memorandum. R. J. Pickering No.75, pp.13 .
38. Engel, M.S. and M. Alexander, 1958. Growth and autotrophic metabolism of

- Nitrosomonas europaea*. *Inter. J. Bacteriol*, (76): 217-222.
39. Edward Charbek, Nirav Patel, 2019. Providencia Infections. *Medscape*, 6 pages.
  40. Fao, 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, pp 223
  41. Far Hadi Zokaei, C.R., B. Saad, H M.Daud, S.A Harmin and S. Shakibazadeh, 2009. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *African journal of Biotechnology*, 8(14): 3369-3376.
  42. Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandao G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S. and dos Santos W.N.L., 2007. Box-Bhenken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta*, (597): 179-186.
  43. Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*, 66: 365-378
  44. Ganesh, E.A., Das, S., Chandrasekar, K., Arun, R. and Balamurugan, S., 2010. Monitoring of total heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. in an aquaculture pond. *Current Research Journal of Biological Sciences* 2(1): 48-52.
  45. George Box and Donald Behnken, 1960. *Some new three level designs for the study of quantitative variables*. *Technometrics*, pp. 455–475.
  46. Gomez-Gil, B., M.A. Herrera-Vega, F.A. Abreu-Grobois and A. Roque, 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol*, 64: 2318-2322.
  47. Gorden, R.E., 1973. *The genus Bacillus*. Agriculture Handbook No.427 Agriculture Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.
  48. Graslund, S. and B.E. Bengtsson, 2001. Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment – a review. *The science of the Total Environment*, 280: 93-131.
  49. Grommen, R., I. Van-Hauteghem, M. Van-Wabeke and W. Verstraete, 2002. An improved nitrifying enrichment to remove ammonium and nitrite from freshwater aquaria systems. *Aquaculture*, 211: 115-124.
  50. Grommen, R., L. Dauwa and W. Verstraete, 2004. Elevated salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters. In

*FEMS. Microbiol. Ecol*, 52: 1-11.

51. Guan. X & Yao. H., 2008. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry* 106 (1): 345-351.
52. Guzik Urszula, Gre Izabela, Wojcieszka Ska Danuta and 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): 285-291.
53. Han, D., San N. O, Angun P., Onarman Umu O. C., Demirci, A. and Tekinay, T., 2014. Response surface optimization of the cultivation conditions and medium composition a novel probiotic strain *Bacillus pumilus* STF26, *International Food Research Journal* 21(4): 1355-1361.
54. Hargreaves, J.A. 2013. *Biofloc Production Systems for Aquaculture*. Southern regional aquaculture center. SRAC Publication No. 4503, 12.
55. Hauben L, Vauterin L, Moore E, Hoste B, Swings J.,1999. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*" . *Int J Syst Bacteriol*. 49 (4): 1749–1760.
56. Herbert R.A., 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, (23): 563-590.
57. Hesselsoe, M. and J. Sorensen, 1998. Microcolony formation as a viability index for ammonia oxidizing bacteria: *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira sp.* *FEMS Microbiol. Ecol*, (28): 383-391.
58. Hesselsoe, M., A. Pederson, K. K. Bundgaard and J. Sørensen, 2001, Nitrification hot spots around degrading red clover (*Trifolium patense*) leave in soil. *Biol. Fertil. Soil*, (33): 238-245. 126.
59. Hoang D.H., Sang H.M., Kien N.T., Bich N.T.K., 2009. Culture of *Panulirus ornatus* lobster fed fish by-catch or co-cultured *Perna viridis* mussel in sea cages in Vietnam. In: Williams, K.C. (Ed.), *Proceedings of an International Symposium on Spiny lobster aquaculture in the Asia-Pacific region. Nha Trang, Vietnam*. December 9-10, 2008, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia, trang 118-125.
60. Hoàng Phương Hà, Đỗ Thị Tố Uyên, Đỗ Thị Liên, Cung Thị Ngọc Mai, Vũ

- Ngọc Huy, Nguyễn Hồng Thu, Lê Lợi, Lê Thị Nhi Công, 2017. Một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn nitrate hóa tuyển chọn và ứng dụng của nó trong nuôi trồng thủy sản. *Tạp chí nghề cá Sông Cửu Long* 9:43-54
61. Hoàng Thị Mỹ Hương, Trần Thị Kim Nhung, Tôn Thất Khoa, Lê Quang Hiệp, Nguyễn Phú Hòa, 2018. Hiện trạng nuôi tôm hùm lồng bè tập trung và chất lượng môi trường nước tại vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. *Tạp chí Khoa Học Công Nghệ Việt Nam*, 60(9):53-58.
62. Huang C., 2020. Extensively drug-resistant *Alcaligenes faecalis* infection. *BMC Infect Dis* 20, 833 pages.
63. Hung Soo Joo, Mitsuyo Hirai and Makoto Shoda, 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (2): 184-191.
64. Joo, H.S., Hirai, M. and Shoda, M., 2006. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No.4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Water Res* 40: 3029–3036.
65. Kiều Hữu Anh và Ngô Tự Thành, 1985. *Vi sinh vật học của các nguồn nước*. Dịch từ nguyên bản tiếng Đức. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật.
66. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K, 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549.
67. Lại Thúy Hiền, Nguyễn Bá Tú, Đỗ Thu Phương, Phạm Thị Hằng, Nguyễn Thị Yên, Vương Thị Nga, Võ Mai Hương, Phạm Ngọc Lan, Nguyễn Thu Thủy, Bùi Lê Thanh Nhân, 2008. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học NITROBACT ứng dụng trong xử lý nước nuôi tôm tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Công Nghệ Sinh Học* 6(2): 249-256.
68. Lại Thúy Hiền, Nguyễn Thị Yên, Vương Thị Nga, 2013. Vi khuẩn tạo chất hoạt hóa bề mặt sinh học *Rhodococcus Ruber* TD2 phân lập từ nước ô nhiễm dầu ven biển vũng tàu. *Tạp Chí Sinh Học*, 35(4): 454-460.
69. Lại Văn Hùng, Phạm Đức Hùng, 2010. Ảnh hưởng của hàm lượng protein và lipid trong thức ăn công nghiệp đến tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm hùm

- bông (*panulirus ornatus fabricius*) giai đoạn nuôi thương phẩm. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 3: 3-8.
70. Lawson T.B., 1995. *Fundamental of aquaculture engineering*. Department of Biological Engineering, Louisiana State University, 335 pages.
71. Le Cong Tuan, Nguyen Duc Huy, Le My Tieu Ngoc, Doan Thi My Lanh, Te Minh Son, Nguyen Hoang Loc, 2021. Nitrogen removal efficiency of some bacterial strains isolated from seawater in Thua Thien Hue, Vietnam, *Advancements in Life Sciences* 8 (2): 182-187.
72. Lei Yang, Yong Xiang Ren, Si Qi Zhao, Xian Liang, Jun ping Wang, 2016. Isolation and characterization of three heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from a sequencing batch reactor. *Ann Microbiol* 66:737–747.
73. Lewis, R.F. and D. Pramer, 1958. *Isolation of Nitrosomonas in pure culture*. Department of Agricultural Microbiology, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey. *J Bacteriol*, 76(5): 524–528.
74. Lê Hồng Phước, Nguyễn Văn Hảo, Nguyễn Nhứt, Đoàn Văn Cường, Cao Thành Trung, Thới Ngọc Bảo, Mã Tú Lan, Phạm Võ Ngọc Ánh, Ngô Thị Ngọc Thủy, Hứa Ngọc Phúc, 2017. Nghiên cứu quy trình công nghệ nuôi thâm canh tôm chân trắng kiểm soát bệnh đốm trắng và hoại tử gan tụy cấp ở quy mô trang trại.
75. Lê Thanh Huyền, Đào Thị Ánh Tuyết, Đỗ Mạnh Hào, 2014. Một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn oxy hóa ammonium phân lập từ vùng ven biển Hải Phòng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển* 14 (3A): 152-158.
76. Lê Xuân Phương, 2007. *Vi sinh vật học môi trường*. Trường Đại học Kỹ thuật Đà Nẵng, 308 trang.
77. Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., Jian, G. and Qin, J. G., 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph xyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*. 274 (1): 80-86.
78. Lloberra, A.T., Bulalacao, M.L. and Tan, A., 1991. *Effect of farming phase and*

- inplant processing on the microbiological quality of prawn (Penaeus monodon)*, pp. 1-5. In: Indo-Pacific Fishery Commission Working Party on Fish Technology and Marketing Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome 19 (22).
79. Logan, Niall A.; Vos, Paul De, 2015. "*Bacillus*", *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, American Cancer Society:1-163.
  80. Lucy Towers, 2014. Spiny Lobster Farming in Viet Nam and the Role of Probiotics During Production. *The fish site*. The University of St Andrews.
  81. Lương Đức Phẩm và Hồ Suồng, 1978. *Vi sinh tổng hợp*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, trang 440-445.
  82. Lương Đức Phẩm, 1998. *Công Nghệ Vi sinh vật*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp 330 trang
  83. MacDonad, R.M. and J.R. Spokes, 1980. A selective diagnostic medium for ammonia oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol.*, 8: 143-145.
  84. Macfarlane, G.T. and R.A. Herbert, 1984. Dissimilatory nitrate reduction and nitrification in estuarine sediments. *J. Gener. Microbiol*, 130: 2301-2308.
  85. Meiklejohn, J., 1950. The isolation of *Nitrosomonas europaea* in pure culture. *J.Gen. Microbiol*, 4: 185-190.
  86. Meunpol, O., K. Lopinyosiri and P. Menasveta, 2003. The effect of azone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Pemaues monodon*). *Aquaculture*, 220: 437-448.
  87. Mohammad Jefri , Woro Hastuti Satyantini , Adriana Monica Sahidu , Daruti Dinda Nindarwi , Rozi, 2020. Application of Probiotics for Organic Matter and Enhancement of Growth Performance in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 12(1): 97-104.
  88. Montgomery, D.C., 1984. *Design and Analysis of Experiments*. 2nd Edn., John Wiley, New York.
  89. Montras, A., B. Pycke, N. Boon, F. Gòdia, M. Mergeay, L. Hendrickx and J.Pérez, 2008. Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in an autotrophic nitrifying biofilm reactor as depicted by molecular analyses and mathematical modelling. *Water Res*, 42: 1700-

- 1714.
90. Moriarty, D.J.W., 1997, The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151: 333-349
  91. Mujeeb Rahiman K. M., Jesmi Y., Thomas A. P. And Mohamed Hatha A. A., 2010. Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Research*, 41( 9): 120 – 134.
  92. Myers, H.R., Khuri, A.I. and Carter, W.H., 1989. *Response Surface Methodology*: 1966-1988. *Technometrics* 31: 137-157.
  93. Niels O.G. Jørgensen, Kristian K. Brandt, Ole Nybroe and Michael Hansen, 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycandegrading bacterium from fresh water and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 : 2195-2199.
  94. Ngô Thanh Phong, 2012. Luận án tiến sĩ “*Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định đạm Pseudomonas spp. từ đất vùng rẫy lúa ở đồng bằng sông Cửu Long và đánh giá hiệu quả trên giống lúa OM2517*”. Trường Đại học Cần Thơ.
  95. Nguyễn Cảnh, 2004. Quy hoạch thực nghiệm. NXB Đại Học Quốc Gia TP.HCM, 157 trang.
  96. Nguyễn Công Tráng, Trần Thị Ngọc Lắm, Huỳnh Thị Quỳnh Như, 2019. Khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ các vùng nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) của tỉnh Bạc Liêu. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Trường Đại Học Nha Trang 4:139-147.
  97. Nguyễn Đức Lượng, 2006. *Công nghệ vi sinh vật: tập 1: Cơ sở vi sinh vật công nghiệp*. NXB Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, 237 trang
  98. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền và Nguyễn Ánh Tuyết, 2006. *Thí nghiệm Công Nghệ Sinh Học tập 2 – thí nghiệm vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia, 463 trang
  99. Nguyễn Lâm Dũng và Nguyễn Nữ Kim Thảo, 2006. *Vi sinh vật học*. NXB

Giáo dục Việt Nam, 540 trang.

100. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 2002. *Vi sinh vật học*. NXB Giáo dục, 520 trang.
101. Nguyễn Ngọc Tiến, Nguyễn Chí Công, Du Văn Toán, 2011. Mô hình chu trình chuyển hoá nitơ trong hệ sinh thái biển áp dụng cho vùng biển Vịnh Bắc Bộ. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển* 11(4): 75 – 96.
102. Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh, Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Đức Minh, Võ Minh Sơn, Trịnh Quang Sơn, Phan Văn Tráng, Đỗ Thị Phượng, Trần Hoàng Bích Ngọc, 2017. Đánh giá tình hình sử dụng chế phẩm vi sinh trong nuôi tôm ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí nghề cá Sông Cửu Long* 10:83-93.
103. 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): 75-81.
104. Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh, Võ Ngọc Yến Nhi, Hoàng Xuân Tin, 2012. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn nitrat hóa để xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản. *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại Học Mở Tp.HCM, 7(1):31 - 38.
105. Olson R.J., 1981. Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum. *J. Mar. Res.*, (39): 227-238.
106. Patricia L. Ramos, Stefanie Van Trappen, Fabiano L. Thompson, Rafael C. 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): 926-931.
107. Peekate L. and Gideon O. Abu, 2017. Optimizing C: N Ratio, C:P Ratio, and pH for Biosurfactant Production by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Advances in Microbiology* 7(2): 1-14.



108. Peizhen Chen, Ji Li, Qing X Li, Yingchun Wang, Shaopeng Li, Tianzhi Ren and Ligang Wang, 2012. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresource Technology* 116: 266-270.
109. Plackett, R.L. and Burman, J.P., 1946. *The Design of Optimum Multifactorial Experiments Biometrika*. 33(4): 305-325.
110. Ponce Garnillo Carol Vianey, Monroy Dosta Maria del Carmen, Jose Alberto Ramirez Torrez, Jose Antonio Ocampo Cervantes and Jorge Castro Mejía, 2016. *Rhodococcus* sp. as probiotic bacteria for increase the survival, growth and coloration of fish *Puntius conchonius*. *Scientific Journal of Animal Science* 5 (12): 370-375.
111. Ponce Granillo, CV., Monroy Dosta, MC., Becerril Cortés, D., Castro Mejía, J., Ocampo Cervantes, JA., 2016. Potential use in aquaculture of *Rhodococcus* sp. (Zopf, 1891). *Digital Journal of El Hombrey su Ambiente Department*, 1 (12): 01-06.
112. Prescott Harley Klein, 2008. *Microbiology*. Seventh Edition. Higher Education, 1222 pages.
113. Price, C.S., Morris, J.A., 2013. *Marine cage culture and the environment: twenty-first century science informing a sustainable industry*. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 164, 158 pages.
114. Priyambodo, B., Jaya, I.S., 2009. Lobster aquaculture in Eastern Indonesia: Part I. Methods evolve for fledgling industry. *Global Aquaculture Advocate*, pp.36-39.
115. Priyambodo, B., Jaya, I.S., 2010. Lobster aquaculture in Eastern Indonesia: Part II. Ongoing research examines nutrition, seed sourcing. *Global Aquaculture Advocate*, pp. 32-33.
116. 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.
117. Phạm Thị Tuyết Ngân, 2012. *Nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển hoá đạm trong bùn đáy ao nuôi tôm sú (Penaeus monodon)*. Luận án Tiến sĩ Nuôi

- trồng thủy sản Đại học Cần Thơ, 159 trang.
118. 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.
  119. Phạm Thị Tuyết Ngân, Trần Sương Ngọc, Hồ Diễm Thơ, 2016. So sánh khả năng cải thiện chất lượng nước và ức chế Vibrio của xạ khuẩn *Streptomyces parvulus* và vi khuẩn *Bacillus subtilis* chọn lọc trong hệ thống nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ số 47B*:87-95.
  120. Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Huỳnh Trường Giang và Vũ Ngọc Út, 2020. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa đạm từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ Tập 56(4B)*:154-160.
  121. Phạm Văn Ty, Vũ Nguyên Thành, 2009. *Công nghệ sinh học; T.5 Công nghệ vi sinh và môi trường*. Giáo dục Việt Nam.
  122. Phillips, B., Matsuda, H., 2011. A global review of spiny lobster aquaculture. In: Fotadar, R.K., Phillips, B.F. (Eds.), *Recent Advances and New Species in Aquaculture*. Wiley-Blackwell, pp. 22-84.
  123. Phương Thị Hương và Vũ Văn Hạnh, 2018. Lựa chọn điều kiện lên men cho sự sinh trưởng chủng *Bacillus subtilis* BSVN15 ứng dụng sản xuất chế phẩm probiotic trong chăn nuôi. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16 (1): 167-172.
  124. Qi-yu Zhang, Ping Yang, Lai-sheng Liu and Zeng-jin Liu, 2020. Formulation and Characterization of a Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Synthetic Microbial Community and its Application to Livestock Wastewater Treatment, *Water*, 12 (218):1-15.
  125. Rennie R.J., Schmidt E.L., 1977. Immunofluorescence studies *Nitrobacter* population in soils. *Can. J. Microbiol*, 23: 1011-1017.
  126. Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 1998. Effect of probiotics on Black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167: 301-313.

127. Robertson, 2006. *Australian Prawn Farming Manual*. Queensland Complete Printing Service, 154 pages.
128. Ryan, Robert P.; Monchy, Sebastien; Cardinale, Massimiliano; Taghavi, Safiyh; Crossman, Lisa; Avison, Matthew B.; Berg, Gabriele; van der Lelie, Daniel; Dow, J. Maxwell, 2009. "The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*". *Nature Reviews Microbiology*. 7(7): 514–525.
129. S Supono, M Rahayu, M W Yusuf, 2019. The Effect of *Bacillus Coagulans* as Feed Probiotics on Non-specific Immunity of Whiteleg Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. Proceedings of the International Conference on Sustainable Biomass (ICSB 2019). *Advances in Engineering Research*, 202: 31-37.
130. Sahu, R., Meghavarnam, A.K. and Janakiraman, S., 2020. Response surface methodology: An effective optimization strategy for enhanced production of nitrile hydratase (NHase) by *Rhodococcus rhodochrous* (RS-6). *Heliyon* 6, e05111.
131. Samocha, 2019. *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp*, 1st Edition. Academic Press printer. eBook ISBN: 9780128182390, 463 pages
132. Sarmila Muthukrishnan, Vikineswary Sabaratnam, Geok Yuan Annie Tan and Ving Ching Chong, 2015. Identification of Indigenous Bacteria Isolated From Shrimp Aquaculture Wastewater With Bioremediation Application: Total Ammoniacal Nitrogen (Tan) And Nitrite Removal. *Sains Malaysiana* 44(8):1103–1110.
133. Schmidt, E.L. and L.W. Belser, 1994. Autotrophic nitrifying bacteria. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S (Eds). *Methods of soil analyses Part 2: Microbiological and biochemical properties*, soil science society of America, Madison, pp. 159-177.
134. Sharmin, F. and M. Rahman, 2007. Isolation and characterization of protease producing *Bacillus* strain FS-1, *Agricultural Engineering International*. The CIGR Journal, 11: 1-10
135. Singh P., Kumari A., Attri C., Seth A., 2017. Enhanced Production Of Nhase Of Alkali Stable *Rhodococcus Pyridinivorans* Nit 36 And Its Application In

- Acrylamide Production, *Ijbpas*, 6 (2): 278-299.
136. Sreekumar G. and Soundarajan Krishnan, 2010. Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology* 9(45): 8078-8084.
137. Stanier RY, Palleroni NJ and Doudoroff M ,1966. The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study\_ *Journal of General Microbiology*. 43 (2): 159–271.
142. Stanley, W. và M. Mandel, 1971. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *J. Bacteriol*, 107: 563-569.
138. Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods, 2016. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. World Health Organization.
139. Su JJ, Yeh KS, Tseng PW, 2006. A strain of *Pseudomonas* sp. isolated from Piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan. *Curr Microbiol* 53:77–81.
140. Sundaram Rajakumar, Pudukadu, Munusamy Ayyasamy, Kuppusamy Shanthi, Palanisami Thavamani, Palanivel Velmurugan, Young Chae Song and Perumalsamy Lakshmanaperumalsamy, 2008. Nitrate removal efficiency of bacterial consortium (*Pseudomonas* sp. KW1 and *Bacillus* sp. YW4) in synthetic nitrate-rich water, *Journal of Hazardous Materials* , 157 (2-3):553:562.
141. Tăng Thị Chính và Đặng Đình Kim, 2007. *Sử dụng chế phẩm vi sinh trong nuôi tôm cao sản*. Viện Công nghệ môi trường, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 120 trang.
142. TCVN 4884-2:2015 (ISO 4833-2:2013). Phần 2: Đếm khuẩn lạc ở 30 °C bằng kỹ thuật cấy bề mặt.
143. TCVN 6663-13:2000 (ISO 5667-13:1997) Phần 13: Hướng dẫn lấy mẫu bùn nước, bùn nước thải và bùn liên quan.
144. TCVN 6663-15:2004 (ISO 5667-15:1999) Phần 15: Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu bùn và trầm tích.

145. Tim Schuurman, Richard F. de Boer, Anna M., Kooistra-Smid D., 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):734–744.
146. Tổng cục thủy sản, 2015. *Báo cáo tổng hợp quy hoạch nuôi tôm hùm đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030*, 122 trang.
147. Tổng Phước Hoàng Sơn, 2015. Kết quả xây dựng bản đồ hiện trạng và bản đồ quy hoạch phát triển nuôi tôm hùm khu vực miền Trung, 20 trang.
148. Tuan, L.A., Mao, N.D., 2005. *Present status of lobster cage culture in Vietnam*. In: Williams, K.C. (Ed.), *Proceedings of a Workshop on Spiny lobster ecology and exploitation in the South China Sea region*. Institute of Oceanography, Nha Trang, Vietnam, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp. 21- 25
149. Thanh Trung Tran, Nathan J. Bott, Nhan Dai Lam, Nam Trung Nguyen, Oanh Hoang Thi Dang, Duc Hoang Le, Lam Tung Le and Ha Hoang Chu, 2019. The Role of *Pseudomonas* in Heterotrophic Nitrification: A Case Study on Shrimp Ponds (*Litopenaeus vannamei*) in Soc Trang Province, *Microorganisms* 7 (155): 1-11.
150. The Global Health Network, 2013. *Bacterial Identification Using BioMerieux API Kits*. COMPRU – AHC, 21 pages
151. Thossaporn Phatthongkleang, Yutthapong Sangnoi, Sompong O-Thong, Arnon Uppabullung and Teeyaporn Keawtawee, 2019. The Efficiency of *Bacillus* spp. to remove ammonia in Shrimp Aquaculture, *Wichcha Journal* 38:1-15.
152. Thuy, N.T.B., Ngoc, N.B., 2004. Current status and exploitation of wild spiny lobsters in Vietnamese waters. In: Williams, K.C. (Ed.), *Proceedings of a Workshop on Spiny lobster ecology and exploitation in the South China Sea region*. Institute of Oceanography, Nha Trang, Vietnam. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp.13-16.
153. Trần Cẩm Vân, 2005. *Vi sinh vật môi trường*. NXB Đại học quốc gia Hà nội,

trang 89-108.

154. Trần Hữu Tâm, 2014. *Nguyên cứu xây dựng qui trình pilot sản xuất sinh khối Bacillus spp. làm nguyên liệu probiotic cung cấp carotenoid*. Luận án TS Dược học, Trường ĐH Y dược Tp.HCM, 220 trang.
155. Trần Linh Thước, 2007. *Phương Pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Nhà XB Giáo Dục, 232 trang.
156. 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
157. Trần Quốc Tuấn, Nguyễn Thị Thu Kiều, Lê Thị Thúy Ái, Đinh Minh Hiệp, Trần Cát Đông, 2014. Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men chủng *Bacillus subtilis* thu nhận nattokinase tái tổ hợp bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. *Tạp Chí Sinh học*, 36:130-137.
158. Trần Thị Thanh, 2000. *Công Nghệ Vi Sinh*. Nhà XB Giáo dục, 167 trang.
159. Trần Vũ Đình Nguyên, Nguyễn Văn Duy, Vũ Ngọc Bội, 2014. Hoạt tính probiotic, đặc điểm phân loại và điều kiện nuôi thích hợp của chủng *Bacillus pumilus* b3.10.2 phân lập từ tôm hùm bông. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 01:177-183
160. Trịnh Hoài Vũ, 2014. Phân lập và xác định khả năng khử đạm của vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* trong nước thải ao nuôi cá tra. *Tạp chí Khoa Học Trường Đại Học An Giang*, 2 (1):16-25.
161. Van Niel CB and Allen MB, 1952. A Note on *Pseudomonas Stutzeri*. *Journal of Bacteriology*. 64(3): 413–422.
162. Vanzella A., Gurreno M.A., Jones R.D., 1985. Effects of CO<sub>2</sub> light on Ammonium and Nitrite oxidation by chemolithotrophic bacteria. *Mar. Ecol.-Pcol. Ser.*, 57: 69-76.
163. Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete, 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 64 :655-671.

164. Vinh, L.T., Huong, L.L., 2009. *Improving environmental quality for Panulirus ornatus lobster aquaculture in Van Phong Bay, Vietnam, by combined culture with Perna viridis mussels*. In: Williams, K.C. (Ed.). Proceedings of an International Symposium on Spiny lobster aquaculture in the Asia Pacific region. Nha Trang, Vietnam, December 9-10, 2008, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia, pp. 59-71.
165. Võ Hồng Phượng, Đặng Ngọc Thùy, Nguyễn Thị Lan Chi, Nguyễn Thanh Trúc, Chu Quang Trọng, Phạm Thị Huyền Diệu, 2019. Nghiên cứu điều kiện tối ưu nuôi cấy thu nhận bào tử *Bacillus S5* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). *Tạp chí Nghề cá Sông Cửu Long*, 13: 45-56.
166. Võ Hồng Phượng, Võ Thị Hậu, Nguyễn Thái Hồng Ngọc, Lê Hồng Phước, Nguyễn Hoàng Tuấn, Nguyễn Hồng Lộc và Lê Thị Bích Thủy, 2014. Khảo sát đặc tính đối kháng của *Bacillus licheniformis* (B1) đối với *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh teo gan tụy cấp tính trên tôm (AHPND) trong điều kiện thí nghiệm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(2): 91-100.
167. Võ Văn Nha, Võ Thị Ngọc Trâm, Lê Hồng Duyệt, Lê Hữu Tình, 2021. Hiệu quả sử dụng chế phẩm vi sinh trong xử lý nước thải của ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh trên cát, *Tạp chí KHKT Thú y*, số 3: 58-67.
168. Võ Văn Nha, 2006. *Kỹ thuật nuôi tôm hùm lông và các biện pháp phòng trị bệnh*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, Việt Nam, 59 trang.
169. Vũ Thế Trụ, 1995. *Thiết lập và điều hành trại sản xuất tôm giống tại Việt Nam*. NXB Nông nghiệp, 25 trang.
170. Vương Thị Nga, Kiều Quỳnh Hoa, Trần Đình Mẫn, Lại Thúy Hiền, 2014. Tối ưu hóa môi trường tạo chất hoạt hóa bề mặt sinh học của chủng *Rhodococcus ruber* TD2 bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. *Tạp Chí Sinh học* 36(3): 360-366.
171. Wanninayate, W.M., T.B. Ratnayate, R.M.T.K and Edirisinghe, 2001. *Experiment culture of tiger shrimp (Penaeus monodon) in low salinity environment in Sri Lanka*. Asian Fisheries Forum, Kaohsiung (Taiwan)

172. Waston W.S., Book E., Harms H., Koops H. and Hooper A.B, 1989. *Nitrifying Bacteria*. In Staley JT, Bryant MPP, Pfenning N, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. III, Baltimore, MD: Wiliams and Wilkins, pp. 1808-1834.
173. Weisi Li, 2013. Study on Characteristics in the Removal Process of Ammonia Nitrogen and Nitrate Nitrogen by an Isolated Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Strain *Rhodococcus sp.*, *Journal of Environmental Protection*, 4(1B): 74 – 79.
174. Whetstone, J.M., G.D. Treece, C. L.B and A.D. Stokes, 2002. Opportunities and Constrains in Marine Shrimp Farming. *Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 2600:1-8*.
175. Winogradsky, S., 1998. *Recherches sur les organismes de la nitrification*. computer rendu. In: Thomas, D. (Ed.), Brock Milestones in Microbiology, ASM Press, 231p.
176. Wyk P.V. và Scarpa J., 1999. *Chapter 8: Water quality requirements and management*, in: Wyk, P.V., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., Main, K.L., Mountain, J., Scarpa, J. (Eds.). Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, pp. 141-162.
177. Xie, F.,Zhu, T., Zhang, F.et al, 2013. Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *Springerplus* 2, 119: 1-5.
178. Xin Ping Yang, Shi Mei Wang, De Wei Zhang, Li Xiang Zhou, 2011, Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1, *Bioresource Technology*, 102 (2): 854-862.
179. Xue Li, Tiannia Wang, Baorong Fu, Xiyang Mu, 2021. Aquaculture Water Quality Improvement by Mixed *Bacillus* and Its Effects on Microbial Community Structure. *Research Square* : 1-19.
180. Yanjie Peng, Yanhui He, Zhansheng Wu, Jianjiang Lu, Chun Li, 2014. Screening and optimization of low-cost medium for *Pseudomonas putida* Rs-198 culture using RSM. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(4): 1229-



1237.

181. Yuni Puji Hastuti, Iman Rusmana, Kukuh Nirmala, Ridwan Affandi and Siska Tridesianti, 2019. Identification and characterization of nitrifying bacteria in mud crab (*Scylla serrata*) recirculation aquaculture system by 16S rRNA sequencing, *Biodiversitas*, 20 (5):1339-1343.
182. Zhang J., Wu P., Hao B., and Z. Yu, 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresource Technology* 102: 9866–986.
183. Zhou, Q., K. Li, X. Jun and L. Bo, 2009. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource technology*, 100: 3780-3786
184. Zweig RD, Morton JD and Stewart MM., 1999. *Source water quality for aquaculture: a guide for assessment*. The World Bank, Washington DC.

# DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ

## 1. Các bài báo khoa học

**Trương Phước Thiên Hoàng**, Trần Ngọc Linh Thùy, Phạm Công Hoạt, Nguyễn Phú Hòa, 2019. Phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng chuyển hóa ammonia từ bùn đáy ở vùng nuôi tôm hùm lồng bè, Tỉnh Phú Yên. *Tạp chí Nông Nghiệp Phát Triển Nông Thôn*, 1:72-78 (ISSN 1859 - 4581).

**Trương Phước Thiên Hoàng**, Võ Trần Quốc Thắng, Đỗ Huỳnh Dân, Nguyễn Phú Hòa, 2021. 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. *Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam*, 63(9): 59 - 64 (ISSN 1859-4794).

**Trương Phước Thiên Hoàng**, Lê Phước Thọ, Vũ Phú Quang, Nguyễn Phú Hòa, Nguyễn Văn Thống, Phạm Công Hoạt, 2021. Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). *Tạp chí Khoa Học Nông Nghiệp Việt Nam*, 19 (11): 1509-1521 (ISSN 1859-0004).

## 2. Các giải pháp hữu ích và sáng chế

**Trương Phước Thiên Hoàng**, Nguyễn Phú Hòa, 2021. Giải pháp hữu ích: Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. chuyển hóa nitơ trong môi trường nước nuôi tôm hùm, Cục sở hữu trí tuệ, Công báo sở hữu công nghiệp, 399 (A-1): 365 - 366 (ISSN 0868- 2534).

**Trương Phước Thiên Hoàng**, Nguyễn Phú Hòa, 2021. Sáng chế: Chủng vi khuẩn *Stenotromonophas pavanii* thuần khiết về mặt sinh học chuyển hóa nitrite trong môi trường nước nuôi tôm hùm, Cục sở hữu trí tuệ, Công báo sở hữu công nghiệp, 401 (A-1): 299 (ISSN 0868- 2534).

## **PHỤ LỤC**

## MỤC LỤC

<b>PHỤ LỤC 1 ( NỘI DUNG 1)</b> .....	<b>5</b>
1.1 Các chỉ tiêu môi trường và mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí, AOB, NOB trong mẫu bùn được thu ở Vùng Vịnh Xuân Đài.....	5
1.2 Phân lập, định danh vi khuẩn <i>Bacillus</i> và khảo sát khả năng chuyển hóa ammonia của các dòng vi khuẩn <i>Bacillus</i> .....	6
1.2.1 Môi trường trypticase soya agar (TSA) ( phân lập <i>Bacillus</i> ).....	6
1.2.2 Hình ảnh các dòng vi khuẩn <i>Bacillus</i> và phản ứng sinh hóa. ....	6
1.2.3 Kết quả định danh sinh học phân tử .....	8
1.2.4 Hiệu suất chuyển hóa ammonia của 13 dòng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.....	10
1.3 Phân lập, định danh vi khuẩn AOB và khảo sát khả năng chuyển hóa ammonia của nhóm vi khuẩn .....	10
1.3.1 Thành phần môi trường .....	10
1.3.2 Tuyển chọn và phân lập nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia.....	11
1.3.3 Hình ảnh đại thể vi khuẩn, gram của các chủng vi khuẩn .....	13
1.3.4 Hình ảnh tra phần mềm phản ứng sinh hóa của nhóm vi khuẩn AOB/NOB.....	14
1.3.5 Kết quả trình tự của các dòng vi khuẩn chuyển hóa ammonia .....	14
1.3.6 Khảo sát chuyển hóa ammonia của 10 chủng vi khuẩn AOB .....	16
1.4 Phân lập, định danh vi khuẩn NOB và khảo sát khả năng chuyển hóa nitrite của nhóm vi khuẩn .....	16
1.4.1 Thành phần môi trường .....	16
1.4.2 Phân lập và định danh nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite .....	17
1.4.3 Kết quả giải trình tự .....	20
1.5. Xây dựng đường chuẩn ammonia, nitrite, nitrate .....	25
1.6 Khảo sát đặc tính chuyển hóa ammonia, nitrite, nitrate và chịu mặn của các dòng vi khuẩn.....	27
<b>PHỤ LỤC 2 ( NỘI DUNG 2)</b> .....	<b>30</b>
2.1 Đường tuyến tính mật số vi sinh vật với OD <sub>600nm</sub> .....	30
2.2 Thành phần môi trường nhân sinh khối .....	30
2.3 Môi trường sản xuất lỏng.....	31
2.4 Thành phần môi trường bán rắn.....	31
2.5. Tạo chế phẩm dạng lỏng .....	31
2.5.1 Khảo sát các điều kiện nhân sinh khối của các dòng vi khuẩn trên môi trường lỏng... 31	
2.5.2 Khảo sát các điều kiện nhân sinh khối của các dòng vi khuẩn trên môi trường sản xuất lỏng (thành phần môi trường mục 2.2) .....	32
2.6. Tạo sản phẩm dạng bột .....	37
2.6.1 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất trên môi trường bán rắn.....	37
2.6.2 Khảo sát các điều kiện bảo quản của các dòng vi khuẩn trên môi trường bán rắn.....	37
<b>PHỤ LỤC 3 (NỘI DUNG 3)</b> .....	<b>39</b>
3.1. Đánh giá sự chuyển hóa N của các dòng vi khuẩn trong nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở qui mô phòng thí nghiệm.....	39
3.2. Đánh giá sự chuyển hóa N của các dòng vi khuẩn trong nước nuôi tôm thẻ chân trắng ở qui mô bể 1m <sup>3</sup> .....	41
3.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến môi trường nước nuôi tôm .....	43

## DANH SÁCH BẢNG

<b>Bảng 1.1</b> Số liệu hiệu suất chuyển hóa ammonia của 7 dòng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.....	10
<b>Bảng 1.2</b> Số liệu hiệu suất chuyển hóa ammonia của 6 dòng vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp .....	10
<b>Bảng 1.3</b> Mật độ vi khuẩn của nhóm AOB trong mẫu bùn.....	11
<b>Bảng 1.4</b> Định tính khả năng chuyển hóa ammonia của các dòng vi khuẩn AOB .....	11
<b>Bảng 1.5</b> Hình ảnh các chủng vi khuẩn của 10 chủng AOB .....	13
<b>Bảng 1.6</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NH}_4^+$ của 10 dòng vi khuẩn AOB .....	16
<b>Bảng 1.7</b> Mật độ vi khuẩn của nhóm NOB trong mẫu bùn.....	17
<b>Bảng 1.8</b> Khả năng chuyển hóa $\text{NO}_2^-$ của các chủng vi khuẩn NOB.....	17
<b>Bảng 1.9</b> Phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn NOB.....	19
<b>Bảng 1.10</b> Hiệu suất chuyển hóa nitrite của 11 dòng vi khuẩn NOB.....	24
<b>Bảng 1.11</b> Định tính khả năng chuyển hóa nitrite và nitrate của các dòng vi khuẩn AOB...	27
<b>Bảng 1.12</b> Định tính khả năng chuyển hóa ammonia và nitrate của các dòng vi khuẩn NOB	28
<b>Bảng 1.13</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NO}_2^-$ của 4 dòng vi khuẩn AOB .....	28
<b>Bảng 1.14</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NO}_3^-$ của 4 dòng vi khuẩn AOB và 4 dòng NOB .....	28
<b>Bảng 1.15</b> Hiệu suất chuyển hóa $\text{NH}_4^+$ của 4 dòng vi khuẩn NOB .....	29
<b>Bảng 1.16</b> Khảo sát khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn AOB.....	29
<b>Bảng 1.17</b> Khảo sát khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn NOB.....	29
<b>Bảng 2.1</b> Thành phần môi trường bán rắn.....	31
<b>Bảng 2.2</b> Ảnh hưởng của môi trường nhân sinh khối đến ba dòng vi khuẩn.....	31
<b>Bảng 2.3</b> Ảnh hưởng của mật độ giống đến nhân sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	31
<b>Bảng 2.4</b> Ảnh hưởng thời gian tăng sinh đến nhân sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	32
<b>Bảng 2.5</b> Ảnh hưởng của tỷ lệ nạp giống đến sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	32
<b>Bảng 2.6</b> Ảnh hưởng của thời gian đến sinh khối ba dòng vi khuẩn .....	32
<b>Bảng 2.7</b> Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	32
<b>Bảng 2.8</b> Ảnh hưởng của pH đến sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	32
<b>Bảng 2.9</b> Ảnh hưởng nguồn nitơ đến sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	33
<b>Bảng 2.10</b> Ảnh hưởng nguồn cacbon đến sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	33
<b>Bảng 2.11</b> Các biến trong ma trận Plackett - Burman và ảnh hưởng của chúng.....	34
<b>Bảng 2.12</b> Ma trận thiết kế Plackett – Burman .....	34
<b>Bảng 2.13</b> Các hệ số trong phương trình hàm mục tiêu.....	34
<b>Bảng 2.14</b> Các biến trong ma trận Plackett - Burman và ảnh hưởng của chúng.....	35
<b>Bảng 2.15</b> Ma trận thiết kế Plackett - Burman .....	35
<b>Bảng 2.16</b> Các hệ số trong phương trình hàm mục tiêu.....	35
<b>Bảng 2.17</b> Các biến trong ma trận Plackett - Burman và ảnh hưởng của chúng.....	36
<b>Bảng 2.18</b> Ma trận thiết kế Plackett - Burman .....	36
<b>Bảng 2.19</b> Các hệ số trong phương trình hàm mục tiêu.....	36
<b>Bảng 2.20</b> Ảnh hưởng của môi trường đến sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	37
<b>Bảng 2.21</b> Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến sinh khối ba dòng vi khuẩn .....	37
<b>Bảng 2.22</b> Ảnh hưởng độ ẩm đến sinh khối ba dòng vi khuẩn .....	37
<b>Bảng 2.23</b> Ảnh hưởng thời gian đến sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	37
<b>Bảng 2.24</b> Ảnh hưởng thời gian đến sinh khối ba dòng vi khuẩn.....	37
<b>Bảng 3.1</b> Chỉ tiêu pH.....	39
<b>Bảng 3.2</b> Hàm lượng ammonia ( Ban đầu là 0,204 mg/L).....	40
<b>Bảng 3.3</b> Hàm lượng nitrite ( Ban đầu là 0,108 mg/L) .....	40
<b>Bảng 3.4</b> Hàm lượng nitrate ( Ban đầu là 0,204 mg/L).....	40
<b>Bảng 3.5</b> Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí (Ban đầu là $2,7 \cdot 10^6$ CFU/ml tương ứng $6,43 \log$ .CFU/mL).....	40
<b>Bảng 3.6</b> Mật độ vi khuẩn AOB ( Ban đầu là $4,7 \cdot 10^2$ CFU/ml tương ứng $2,67 \log$ .CFU/mL).....	40

<b>Bảng 3.7</b> Mật độ vi khuẩn nitrite ( Ban đầu là $1,2.10^2$ CFU/ml tương ứng $2.08 \log.CFU/mL$ ) .....	41
<b>Bảng 3.8</b> Một số chỉ tiêu môi trường nước trong thí nghiệm.....	41
<b>Bảng 3.9</b> Một số chỉ tiêu môi trường nước khác trong thí nghiệm .....	41
<b>Bảng 3.10</b> Mật độ vi khuẩn hiếu khí ( $\log_{10}.CFU/mL$ ) .....	41
<b>Bảng 3.11</b> Mật độ vi khuẩn <i>vibrio</i> ( $\log_{10}.CFU/mL$ ) .....	42
<b>Bảng 3.12</b> Mật độ vi khuẩn A0B ( $\log_{10}.CFU/mL$ ) .....	42
<b>Bảng 3.13.</b> Mật độ vi khuẩn NOB ( $\log_{10}.CFU/mL$ ).....	42
<b>Bảng 3.14</b> Tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm .....	43
<b>Bảng 3.15</b> Hàm lượng TAN trong thời gian 30 ngày thử nghiệm tôm ở bể .....	46
<b>Bảng 3.16</b> Hàm lượng Nitrite trong thời gian 30 ngày thử nghiệm tôm ở bể .....	47
<b>Bảng 3.17</b> Hàm lượng Nitrate trong thời gian 30 ngày thử nghiệm tôm ở bể .....	48
<b>Bảng 3.18</b> Tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm thử nghiệm tôm ở bể .....	49

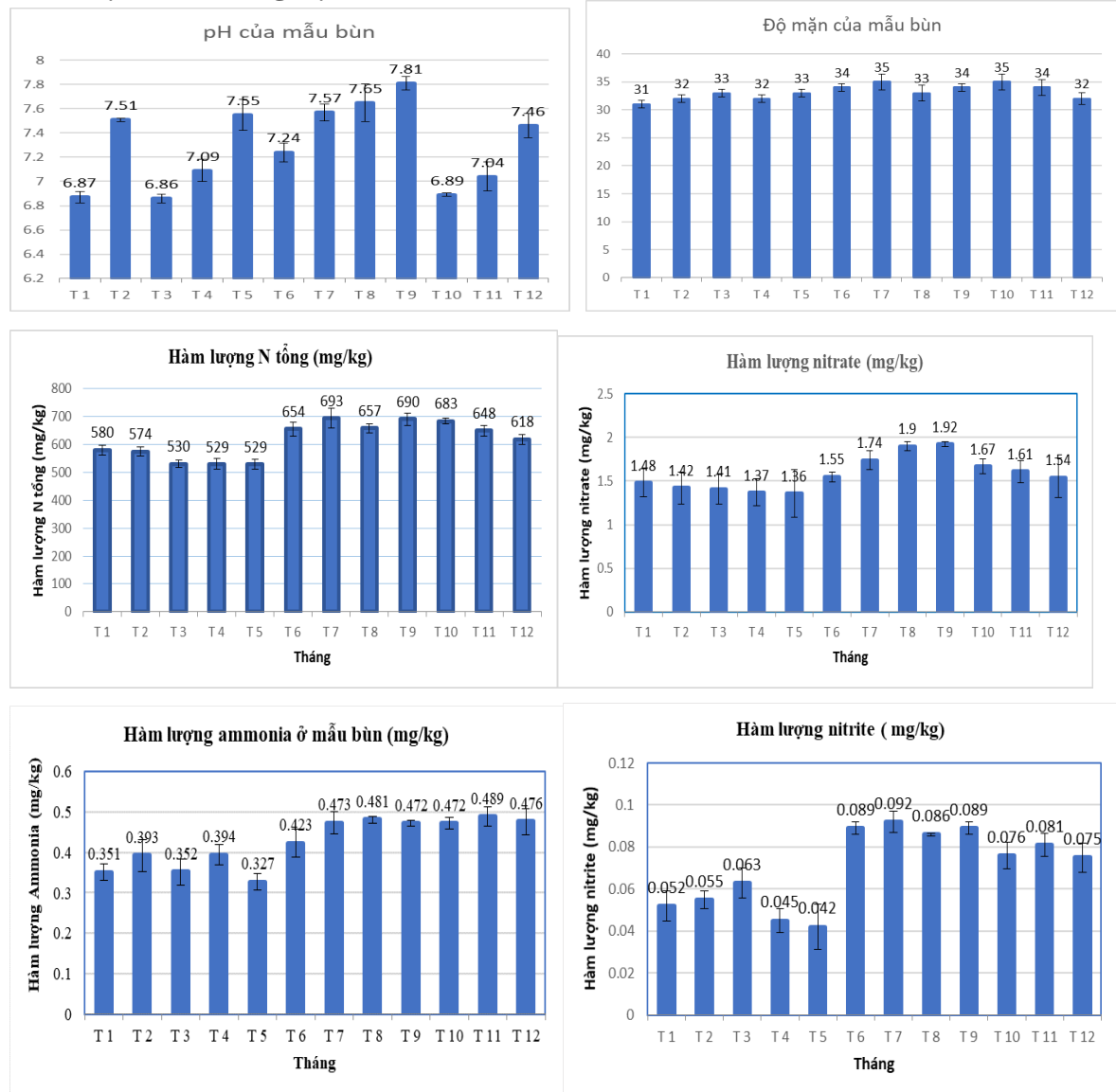
## DANH SÁCH HÌNH

<b>Hình 1.1</b> Các chỉ tiêu môi trường của mẫu bùn .....	5
<b>Hình 1.2</b> Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí, nhóm AOB, NOB trong mẫu bùn .....	5
<b>Hình 1.3</b> Một số hình ảnh thu mẫu ở Vịnh Xuân Đài .....	6
<b>Hình 1.4</b> Các dòng vi khuẩn và các phản ứng sinh hóa .....	7
<b>Hình 1.5</b> Định tính khả năng chuyển hóa ammonia của <i>Bacillus</i> sp. ....	7
<b>Hình 1.6</b> Sự hiện diện của nhóm AOB trong mẫu bùn .....	11
<b>Hình 1.7</b> Một số khuẩn lạc phân lập tại Vịnh Xuân Đài .....	12
<b>Hình 1.8</b> Định tính khả năng chuyển hóa ammonia của nhóm AOB .....	12
<b>Hình 1.9</b> Sự hiện diện của vi khuẩn NOB trong mẫu bùn .....	17
<b>Hình 1.10</b> Một số khuẩn lạc NOB phân lập tại Vịnh Xuân Đài .....	18
<b>Hình 1.11</b> Định tính khả năng chuyển hóa nitrite của chủng vi khuẩn NOB. ....	18
<b>Hình 1.12</b> Đường chuẩn ammonia .....	25
<b>Hình 1.13</b> Đường chuẩn nitrite .....	25
<b>Hình 1.14</b> Đường chuẩn nitrate .....	25
<b>Hình 2.1</b> Đường tuyến tính của vi khuẩn <i>Bacillus licheniformis</i> B85 .....	30
<b>Hình 2.2</b> Đường tuyến tính của vi khuẩn <i>P. stutzeri</i> KL15 .....	30
<b>Hình 2.3</b> Đường tuyến tính của vi khuẩn <i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub> .....	30
<b>Hình 2.4</b> Khảo sát hàm lượng mật rỉ của <i>B.licheniformis</i> B85 .....	33
<b>Hình 2.5</b> Khảo sát hàm lượng mật rỉ của <i>P. stutzeri</i> KL15 .....	33
<b>Hình 2.6</b> Khảo sát hàm lượng mật rỉ của <i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub> .....	33
<b>Hình 2.7</b> Khảo sát hàm lượng cao nấm men của <i>B.licheniformis</i> B85 .....	33
<b>Hình 2.8</b> Khảo sát hàm lượng cao nấm men của <i>P. stutzeri</i> KL15 .....	33
<b>Hình 2.9</b> Khảo sát hàm lượng pepton của <i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub> .....	33
<b>Hình 2.10</b> Nguyên liệu từ trái qua phải : cám bắp, bã đậu nành, cám gạo và cám mì .....	38
<b>Hình 2.11</b> Hình ảnh lên men tăng sinh, sản xuất lỏng và bán rắn .....	38
<b>Hình 3.1</b> Thử nghiệm nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng trong PTN .....	39
<b>Hình 3.2</b> Một số hình ảnh thử nghiệm tôm .....	45
<b>Hình 3.3</b> Mật số vi khuẩn <i>Vibrio</i> sp., mật số vi khuẩn AOB, NOB và tổng vi khuẩn hiếu khí .....	45

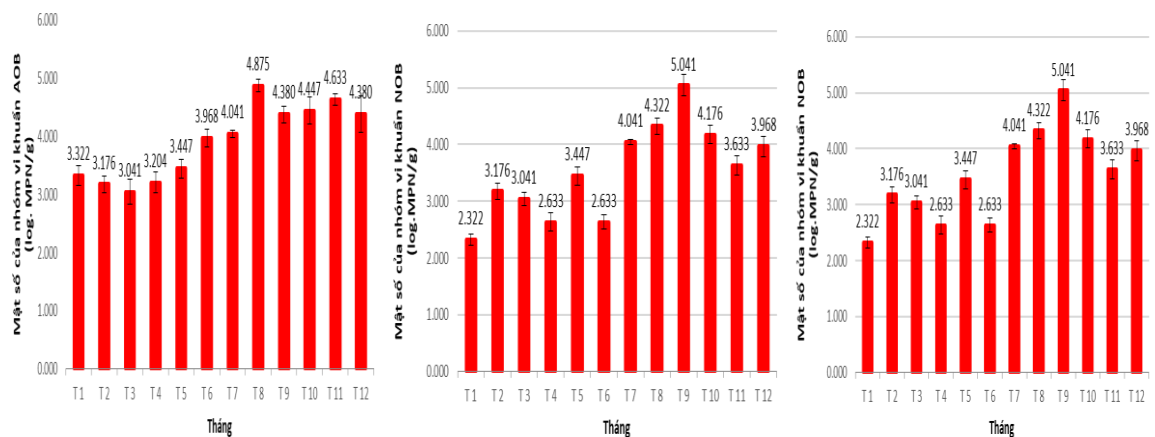
## PHỤ LỤC 1 (NỘI DUNG 1)

### Nội dung 1:

#### 1.1 Các chỉ tiêu môi trường và mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí, AOB, NOB trong mẫu bùn được thu ở Vùng Vịnh Xuân Đài



Hình 1.1 Các chỉ tiêu môi trường của mẫu bùn



Hình 1.2 Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí, nhóm AOB, NOB trong mẫu bùn



## 1.2 Phân lập, định danh vi khuẩn *Bacillus* và khảo sát khả năng chuyển hóa ammonia của các dòng vi khuẩn *Bacillus*

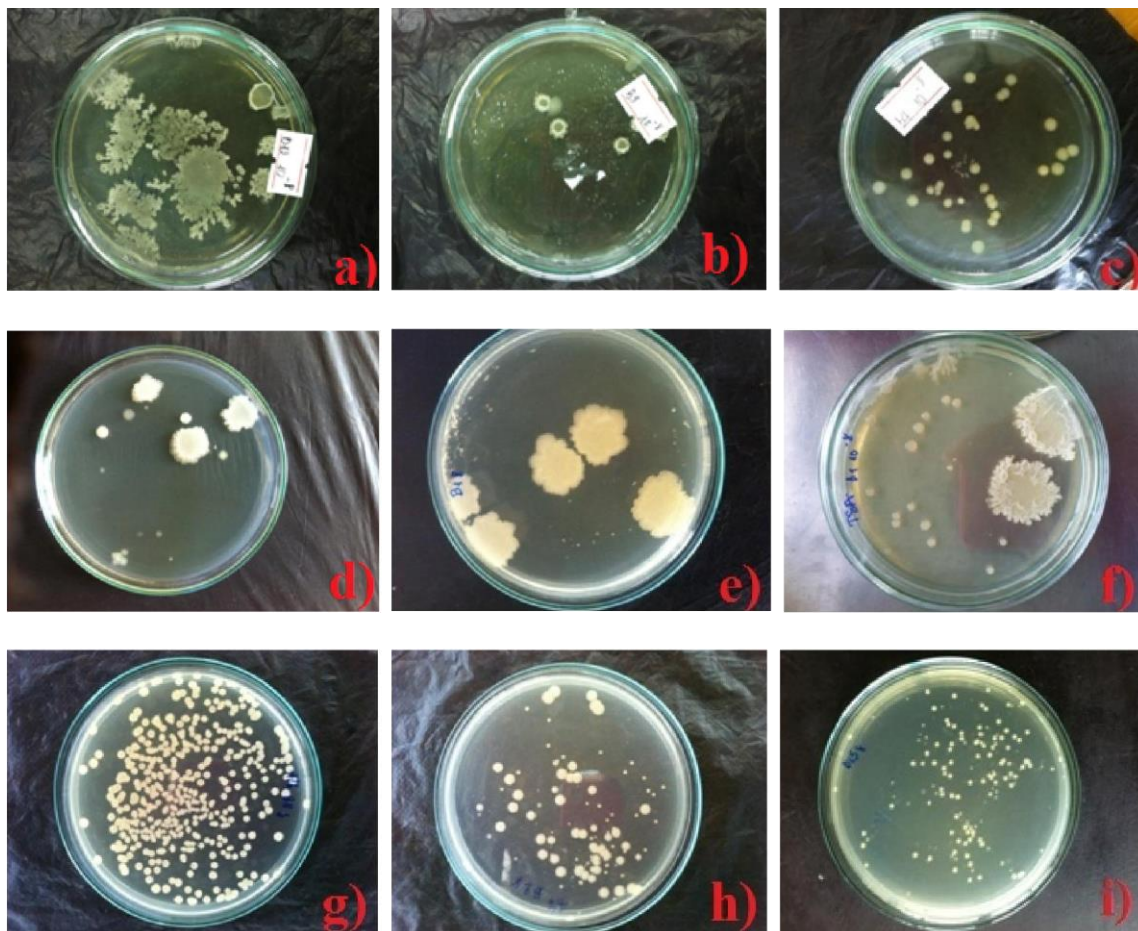


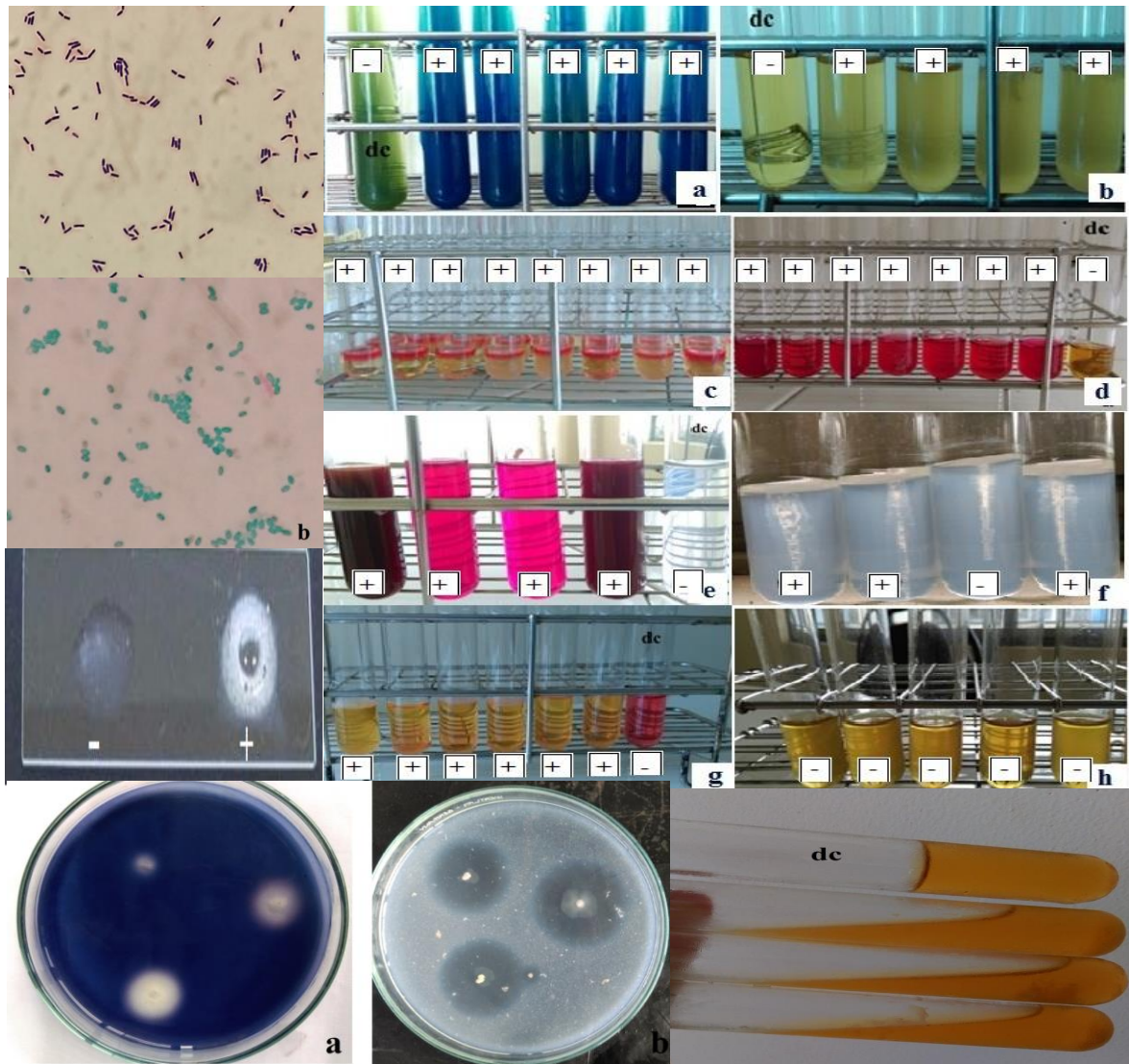
**Hình 1.3** Một số hình ảnh thu mẫu ở Vịnh Xuân Đài

### 1.2.1 Môi trường trypticase soya agar (TSA) ( phân lập *Bacillus* )

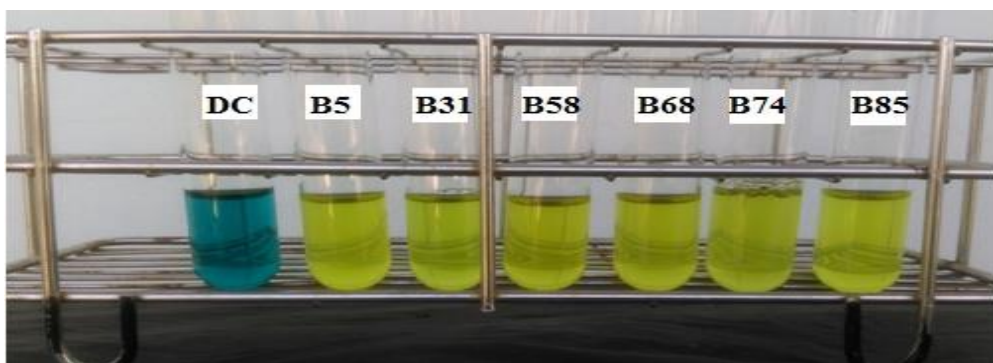
Soya peptone	15g
Tryptone peptone	5g
Agar	18g
NaCl	5g
Nước cất	1000ml
pH 7,3	

### 1.2.2 Hình ảnh các dòng vi khuẩn *Bacillus* và phản ứng sinh hóa.





**Hình 1.4** Các dòng vi khuẩn và các phản ứng sinh hóa



**Sera Ammonium/Ammoniak-Test (NH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub>)**

a)	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	5 mg/l	10 mg/l
b)	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	2 mg/l	5 mg/l

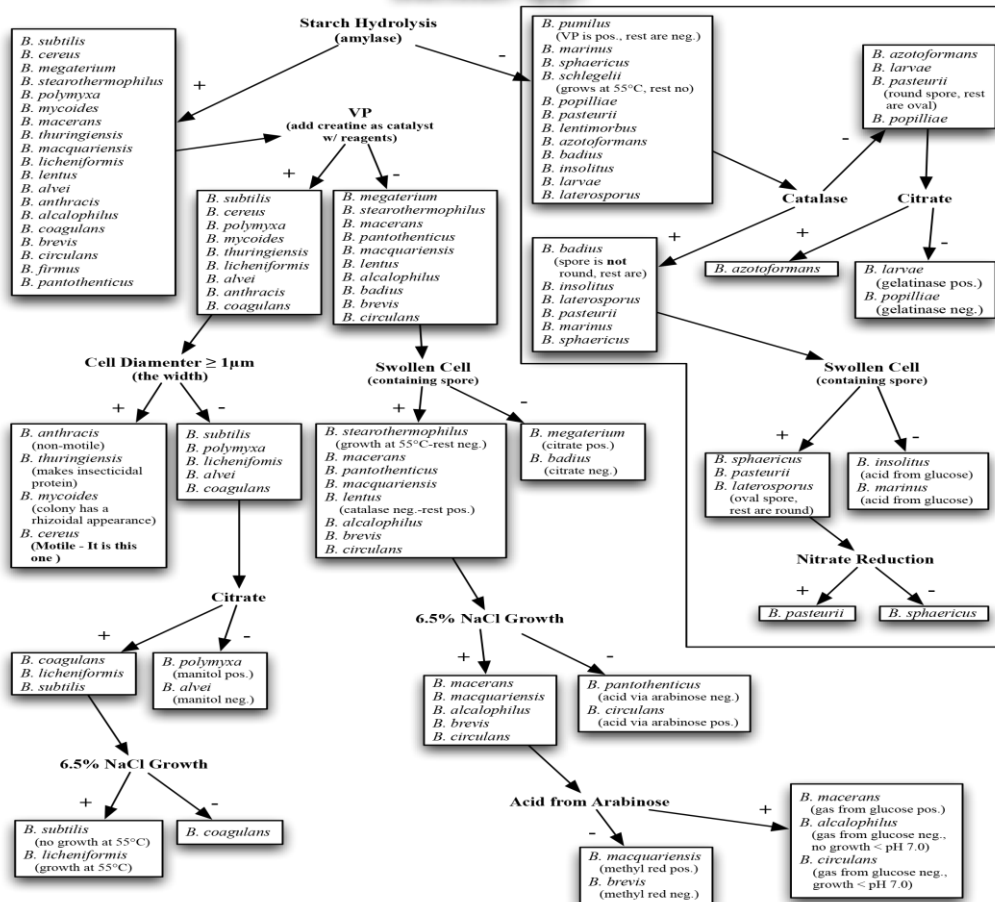


**Hình 1.5** Định tính khả năng chuyển hóa ammonia của *Bacillus* sp.

➤ **Khóa phân loại Bergey của nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp.**  
**Identification flow charts**

**Bacillus spp. ID Flowchart**

**Bacillus spp.**



**1.2.3 Kết quả định danh sinh học phân tử**

**Kết quả giải trình tự dòng B2**

AGTGCCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTAGAACGGCACTTGTTCT  
 TCCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCC  
 GTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC  
 CGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGTCGCCTT  
 GGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAG  
 CCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCC  
 CGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTC  
 CGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGATGTATTAGGC  
 ACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCCAAAATAAACCCA

**Kết quả giải trình tự dòng B5**

TGGTGGGGGGGAAGAACAATACTTGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTC  
 CCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG  
 ATAACCTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAAC  
 ATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG  
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC  
 AACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC  
 CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGAT  
 CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGAC  
 GGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAACACC

**Kết quả giải trình tự dòng B31**

ATCGGGTGGCCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTG  
 TTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGC  
 TCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG  
 GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTTCGGCTACGCATCGTCG  
 CCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTG  
 GTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTA  
 GCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACC  
 CGTCCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATT  
 AGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTCAA

**Kết quả giải trình tự dòng B58**

AGGGGGGAACGTTGCCTAATAAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCC  
 CTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGA  
 TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACA  
 TAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT  
 GAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
 CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
 GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATC  
 GTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACG  
 GTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCCGGTAATAAAA

**Kết quả giải trình tự dòng B68**

AGTTGGGGGGCGTGCCTATACTGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGA  
 TGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC  
 TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAA  
 AGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG  
 TAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT  
 GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA  
 TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAA  
 AGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTAC  
 CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCCGGTAATAAAA

**Kết quả giải trình tự dòng B74**

CCGTGGCTTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTT  
 TTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCC  
 GTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC  
 CGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTTCGGCTACGCATCGTTGCCTT  
 GGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAG  
 CCAAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCC  
 GGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTC  
 GCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCA  
 CGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCAGAATCAAACCTCTCAA

**Kết quả giải trình tự dòng B85**

ACCCTTGCTTTTCTGGTAAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTT  
 CTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTC  
 CGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG  
 CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTTCGGCTACGCATCGTTGCCT  
 TGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTGA  
 GCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCC  
 CGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTC  
 CGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGC  
 ACGCCGCCAGCGTTCGTCCCTGAGCCAGGATCCAAACTCAATCAA

**Kết quả giải trình tự dòng B91**

AGGGGCCGGGGTGCCTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAT  
 GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT  
 CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAA  
 GGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT  
 AACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG

GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT  
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA  
GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACC  
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCCGGTAATAAACA.

### 1.2.4 Hiệu suất chuyển hóa ammonia của 13 dòng vi khuẩn *Bacillus* sp.

**Bảng 1.1** Số liệu hiệu suất chuyển hóa ammonia của 7 dòng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Chủng vi khuẩn	Hàm lượng NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L) chuyển hóa					Hiệu suất chuyển hóa (%)
	6	12	24	36	48	
<b>B2</b>	0,576 <sup>b</sup> ±0,03	0,408 <sup>bc</sup> ±0,05	0,199 <sup>de</sup> ±0,02	0,104 <sup>cd</sup> ±0,02	0,041 <sup>c</sup> ±0,01	88,6
<b>B7</b>	0,358 <sup>d</sup> ±0,03	0,227 <sup>d</sup> ±0,04	0,155 <sup>e</sup> ±0,02	0,068 <sup>d</sup> ±0,01	0,035 <sup>c</sup> ±0,01	92,6
<b>B9</b>	0,469 <sup>c</sup> ±0,03	0,354 <sup>bcd</sup> ±0,05	0,215 <sup>bcd</sup> ±0,03	0,148 <sup>bc</sup> ±0,02	0,064 <sup>bc</sup> ±0,03	83,8
<b>B11</b>	0,564 <sup>b</sup> ±0,03	0,460 <sup>b</sup> ±0,01	0,246 <sup>bcd</sup> ±0,06	0,162 <sup>bc</sup> ±0,06	0,074 <sup>bc</sup> ±0,03	82,3
<b>B12</b>	0,525 <sup>bc</sup> ±0,04	0,356 <sup>bcd</sup> ±0,03	0,237 <sup>bcd</sup> ±0,03	0,167 <sup>bc</sup> ±0,04	0,089 <sup>bc</sup> ±0,05	81,8
<b>B18</b>	0,469 <sup>c</sup> ±0,03	0,354 <sup>bcd</sup> ±0,06	0,198 <sup>de</sup> ±0,06	0,129 <sup>bcd</sup> ±0,03	0,085 <sup>bc</sup> ±0,04	85,9
<b>B91</b>	0,530 <sup>bc</sup> ±0,02	0,366 <sup>bcd</sup> ±0,05	0,205 <sup>de</sup> ±0,03	0,172 <sup>bc</sup> ±0,02	0,143 <sup>b</sup> ±0,01	81,2

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,01$ ).

**Bảng 1.2** Số liệu hiệu suất chuyển hóa ammonia của 6 dòng vi khuẩn *Bacillus* sp (Hình 3.2)

Thời gian (giờ)	Hàm lượng NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L) chuyển hóa					
	B5	B31	B58	B68	B74	B85
<b>6</b>	0,233 <sup>c</sup> ± 0,1	0,862 <sup>b</sup> ± 0,1	1,973 <sup>a</sup> ± 0,1	0,751 <sup>b</sup> ± 0,01	1,973 <sup>a</sup> ± 0,1	1,010 <sup>b</sup> ± 0,064
<b>12</b>	3,146 <sup>a</sup> ± 0,1	1,073 <sup>c</sup> ± 0,1	2,221 <sup>b</sup> ± 0,064	3,220 <sup>a</sup> ± 0,11	2,221 <sup>b</sup> ± 0,064	2,332 <sup>b</sup> ± 0,064
<b>24</b>	8,987 <sup>b</sup> ± 0,08	10,515 <sup>a</sup> ± 0,1	8,198 <sup>c</sup> ± 0,034	8,404 <sup>c</sup> ± 0,12	8,254 <sup>c</sup> ± 0,1	9,046 <sup>b</sup> ± 0,063
<b>36</b>	0,468 <sup>a</sup> ± 0,01	0,211 <sup>c</sup> ± 0,034	0,305 <sup>bc</sup> ± 0,006	0,509 <sup>a</sup> ± 0,14	0,248 <sup>c</sup> ± 0,009	0,417 <sup>ab</sup> ± 0,062
<b>48</b>	0,040 <sup>c</sup> ± 0,003	0,121 <sup>bc</sup> ± 0,013	0,267 <sup>a</sup> ± 0,002	0,074 <sup>c</sup> ± 0,04	0,187 <sup>b</sup> ± 0,029	0,155 <sup>b</sup> ± 0,02
<b>Hiệu suất chuyển hóa (%)</b>	99,7	99,1	97,9	99,4	98,6	98,8

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

## 1.3 Phân lập, định danh vi khuẩn AOB và khảo sát khả năng chuyển hóa ammonia của nhóm vi khuẩn

### 1.3.1 Thành phần môi trường

**Môi trường phân lập vi khuẩn:** môi trường ammonium-calcium-carbonate được sử dụng để phân lập vi khuẩn dựa theo phương pháp của Ehrlich (1975)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,03g
NaCl	0,3g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3g
CaCO <sub>3</sub>	7,5g

**Môi trường nuôi tăng sinh vi khuẩn** được chuẩn bị theo công thức môi trường của Lewis và Pramer (1958) và MacDonad và Spokes (1980).

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
NaHCO <sub>3</sub>	0,5g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0142g

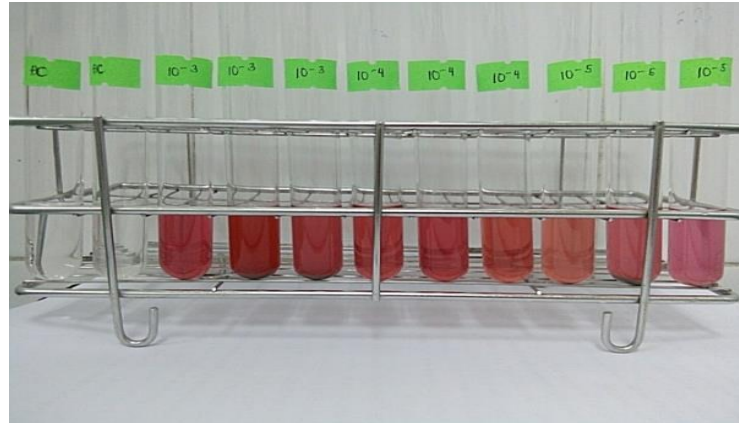
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

0,0184g

**Thuốc thử Griess – Ilosway** dùng để kiểm tra sự hiện diện của NO<sub>2</sub><sup>-</sup> bao gồm dung dịch A (thuốc thử acid sulfanilic), dung dịch B (thuốc thử N –(1-naphthyl) ethylenediamine) và dung dịch C (thuốc thử alpha- Naphthol) được chuẩn bị sẵn.

Một ít Tris HCl được thêm vào để tránh sự kết tủa của các nguyên tố vi lượng trong môi trường (thể tích 1000 ml nước cất). (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> được tiệt trùng chuyên biệt sau đó thêm vào dung dịch môi trường trong điều kiện vô trùng.

### 1.3.2 Tuyển chọn và phân lập nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia



Ghi chú: trắng (-), đỏ (+)

**Hình 1.6** Sự hiện diện của nhóm AOB trong mẫu bùn

**Bảng 1.3** Mật độ vi khuẩn của nhóm AOB trong mẫu bùn

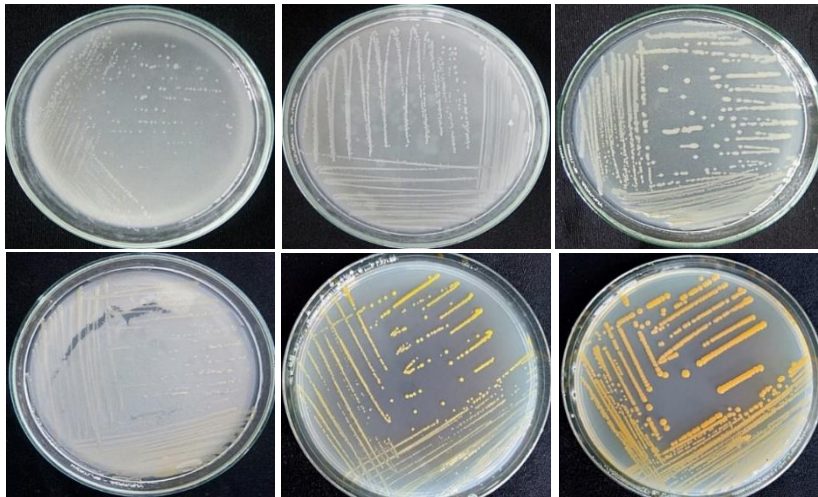
STT	Ký hiệu mẫu	MPN /gam	STT	Ký hiệu mẫu	MPN /gam
1	BT1	1,5 x 10 <sup>4</sup>	12	BC12	1,6 x 10 <sup>3</sup>
2	BT2	1,5 x 10 <sup>4</sup>	13	BC13	2,4 x 10 <sup>3</sup>
3	BT3	4,3 x 10 <sup>3</sup>	14	BC14	1,5 x 10 <sup>4</sup>
4	BT4	1,2 x 10 <sup>4</sup>	15	BC15	1,6 x 10 <sup>3</sup>
5	BT5	7,5 x 10 <sup>3</sup>	16	BC16	2,4 x 10 <sup>3</sup>
6	BT6	7,5 x 10 <sup>3</sup>	17	BC17	2,1 x 10 <sup>3</sup>
7	BT7	4,3 x 10 <sup>3</sup>	18	BC18	2,8 x 10 <sup>3</sup>
8	BT8	2,1 x 10 <sup>4</sup>	19	BC19	2,4 x 10 <sup>3</sup>
9	BT9	1,5 x 10 <sup>4</sup>	20	BC20	2,1 x 10 <sup>3</sup>
10	BT10	9,3 x 10 <sup>3</sup>	21	BC21	2,4 x 10 <sup>3</sup>
11	BC11	0,9 x 10 <sup>3</sup>	22	NTĐC	< 3

**Bảng 1.4** Định tính khả năng chuyển hóa ammonia của các dòng vi khuẩn AOB

Dòng	Chuyển hóa NH <sub>3</sub>	Dòng	Chuyển hóa NH <sub>3</sub>
KL1	++	KL19	+
KL2	++++	KL20	++
KL3	+	KL21	++++
KL4	+++	KL22	+
KL5	++	KL23	+++

<b>KL6</b>	+	<b>KL24</b>	+
<b>KL7</b>	+	<b>KL25</b>	++
<b>KL8</b>	++	<b>KL26</b>	++++
<b>KL9</b>	++	<b>KL27</b>	++
<b>KL10</b>	++++	<b>KL28</b>	+
<b>KL11</b>	++++	<b>KL29</b>	+
<b>KL12</b>	+	<b>KL30</b>	++++
<b>KL13</b>	+	<b>KL31</b>	+
<b>KL14</b>	++++	<b>KL32</b>	+
<b>KL15</b>	++++	<b>KL33</b>	++++
<b>KL16</b>	+++	<b>KL34</b>	+++
<b>KL17</b>	++	<b>KL35</b>	++++
<b>KL18</b>	+++	<b>ĐC</b>	-

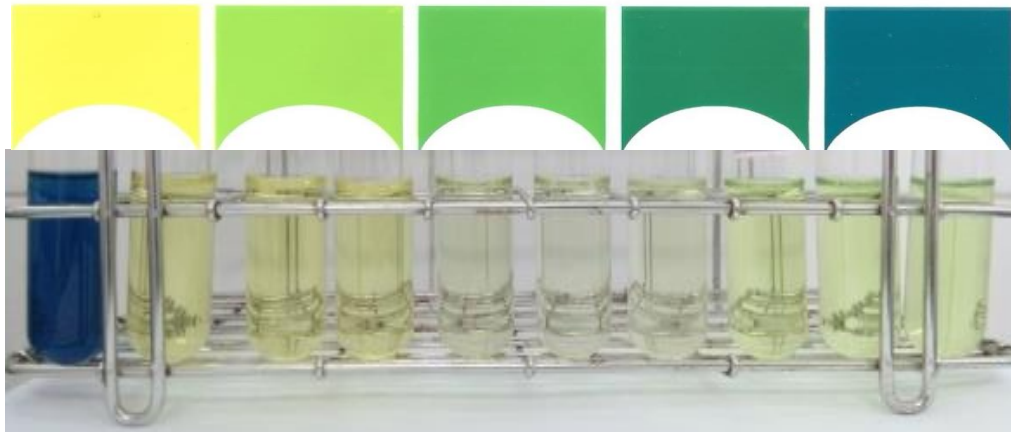
Ghi chú: (+) rất yếu, (++) yếu, (+++) vừa, (++++) mạnh



Hình 1.7 Một số khuẩn lạc phân lập tại Vịnh Xuân Đài

**Sera Ammonium/Ammoniak-Test (NH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub>)**










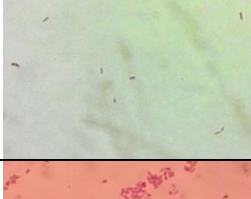

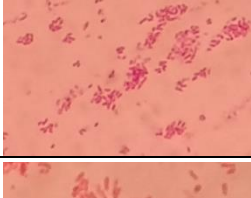



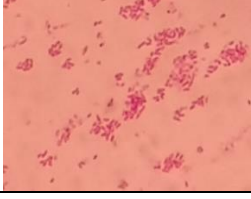
a) 0 mg/l      0,5 mg/l      1 mg/l      5 mg/l      10 mg/l  
b) 0 mg/l      0,5 mg/l      1 mg/l      2 mg/l      5 mg/l



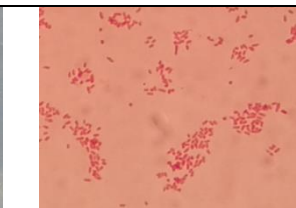
Hình 1.8 Định tính khả năng chuyển hóa ammonia của nhóm AOB  
(Ghi chú: xanh (-), vàng (+))

### 1.3.3 Hình ảnh đại thể vi khuẩn, gram của các chủng vi khuẩn

**Bảng 1.5** Hình ảnh các chủng vi khuẩn của 10 chủng AOB

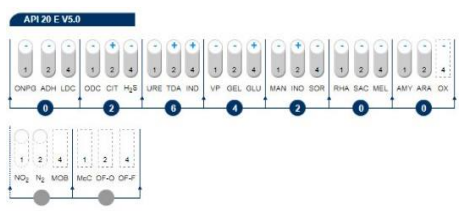
Chủng vi khuẩn (1)	Đại thể (2)	Vi thể (3)	Mô tả (4)
KL2			Đại thể: Khuẩn lạc tròn, nhầy, màu trắng sữa, rìa răng cưa. Vi thể: Tế bào gram âm, hình que ngắn, gần tròn, tồn tại ở dạng đơn, đôi hoặc tụ thành đám.
KL10			Đại thể: Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục nhạt. Vi thể: Tế bào hình que, gram âm.
KL11			Đại thể: Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng hơi vàng. Vi thể: tế bào gram âm, hình que.
KL14			Đại thể: Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu vàng nhạt. Vi thể: tế bào hình que, gram âm.
KL15			Đại thể: Khuẩn lạc khô, nhẵn, không có hình dạng cố định, màu vàng. Vi thể: Tế bào gram âm, hình que dài, nhỏ.
KL21			Đại thể: Khuẩn lạc tròn, lồi nhầy, có màu vàng nhạt. Vi thể: Tế bào gam dương, hình que ngắn, tù ở 2 đầu, tồn tại ở dạng đơn.
KL26			Đại thể: Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, bóng nhót, màu hồng dâu. Vi thể: Tế bào hình cầu, gram âm
KL30			Đại thể: Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục, khuẩn lạc nhẵn ở rìa sau 48h cấy. Vi thể: Tế bào hình que, gram dương.



<p>KL33</p>			<p>Đại thể: Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục, có tâm màu trắng đậm hơn ở giữa. Vi thể: Tế bào hình que, gram âm</p>
<p>KL35</p>			<p>Đại thể: Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu vàng. Vi thể: tế bào hình cầu, gram âm.</p>

### 1.3.4 Hình ảnh tra phần mềm phản ứng sinh hóa của nhóm vi khuẩn AOB/NOB

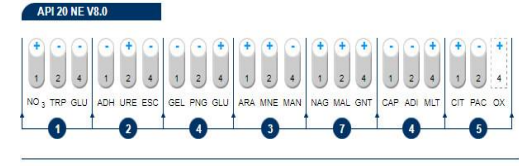
API 20 E V5.0



REFERENCE: DATE: 5/10/21  
COMMENT:

GOOD IDENTIFICATION			
Strip	API 20 E V5.0		
Profile	0 2 6 4 2 0 0		
Note			
Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Providencia azarovi</i>	97.5	1.0	
Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Providencia albifaciens/ivestigianii</i>	2.3	0.67	1%

API 20 NE V8.0



REFERENCE: DATE: 5/10/21  
COMMENT:

EXCELLENT IDENTIFICATION			
Strip	API 20 NE V8.0		
Profile	1 2 4 3 7 4 5		
Note	ID NOT VALID BEFORE 48-H/POSSIBILITY OF <i>Brucella</i> spp		
Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99.9	0.94	
Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Pasteurella aerogenes</i>	0.1	0.0	GLU 97%   PNP/PG 100%   CITa 0%

### 1.3.5 Kết quả trình tự của các dòng vi khuẩn chuyển hóa ammonia

#### Kết quả giải trình tự dòng KL2:

TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAG  
TCGAGCGGGGAAGGTAGCTTGCTACCGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT  
TAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATA  
GTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTC  
GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGA  
GAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA  
GAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTCTAGTTAATACC  
TAGGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCACAGCCGC  
GGTAA.

#### Kết quả giải trình tự dòng KL10:

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGA  
GCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCATTTGC  
TACGGAATAACTCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGAGCCCCGAAAGGGGAAAGA  
TTTATCGGCAAATGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC  
CAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGAC  
ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGC  
CTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACC  
GGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCAGCAGCC  
GCGGTA.

#### Kết quả giải trình tự dòng KL11:

TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAG  
TCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT  
AGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATA  
GTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCAGCTATCAGATGAGCCTAGGTC  
GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGA  
GAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGAGGCAGCA

GTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG  
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCT  
TGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAA

**Kết quả giải trình tự dòng KL14:**

TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAG  
TCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT  
AGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAAC  
GTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTC  
GGATTAGCTAGTTGGTGAAGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGA  
GAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA  
GAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACC  
TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCG  
CGTA

**Kết quả giải trình tự dòng KL15:**

CGTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTAT  
CAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAAGGCTACCAAGGCGACG  
ATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC  
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGG  
GCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACT  
TCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG  
CGTAAAGCG.

**Kết quả giải trình tự dòng KL21:**

TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAG  
TCGAACGGCAGCGCGGGGCAACCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATATATC  
GGAACGTACCCAAGAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACG  
ATCTATGGATGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGTGCTCCTGGAGCGGCCGATATCT  
GATTAGCTAGTTGGTGAAGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAG  
AGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGGGGAATTTTGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGAAG  
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTCAGGGAAGAAACGGCTGTGGCTAATATCCA  
CGGCTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAA

**Kết quả giải trình tự dòng KL26:**

GGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGGACGGGATCCATC  
GGAGAGCTTGCTCGAAGATGGTGAAGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGAGCAAC  
CTACCTCTATCAGGGGGATAGCCTCTCGAAAGAGAGATTAACCGCATAACATCAACA  
GTTTCGCATGTTTCGGTTGATTAAATATTTATAGGATAGAGATGGGCTCGCGTGACATTA  
GCTAGTTGGTAGGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGTCTAGGGGCTCTGAGAGGA  
GAATCCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAA  
GGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACTG  
CCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGTCCAGGAATAAACCTAAATACGTGTATTTAGCTG  
AATGTACTGGAAGAATAAGGATCGGCTAACTC CGTGCCAGCAGCCGCGGT.

**Kết quả giải trình tự dòng KL30:**

TTTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAA  
GTCGAGCGGTAACAGGGGAAGCTTGCTTCTCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTA  
ATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACC  
GCATAATCTCTTAGGAGCAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTGTGCGGATGAACC  
CATATGGGATTAGCTAGTAGGTAAGGTAATGGCTTACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG  
GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG  
CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGTACTTTAG  
TCGGGAGGAAGGCGTTGATGTTAATACCATCAACGATTGACGTTACCGACAGAAGAA  
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA

**Kết quả giải trình tự dòng KL33:**

GATCCTGGCTCAGATTGAACGCTAGCGGGATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAG  
 CGCGAGAGAGCTTGCTCTCTTGCGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATATATCGGAA  
 CGTGCCAGTAGCGGGGATAACTACTCGAAAGAGTGGCTATACCGCATAACGCCCTAC  
 GGGGAAAGGGGGGATCGCAAGACCTCTACTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTA  
 GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGAC  
 GACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
 GAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTATGATGAAGGCC  
 TTCGGGTTGTAAAGTACTTTTGGCAGAGAAGAAAAGGTATCCCCTAATACGGGATACT  
 GCTGACGGTATCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA

**Kết quả giải trình tự dòng KL35:**

ATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA  
 GCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCC  
 CTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCCTACCG  
 CATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGT  
 TGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCG  
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA  
 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG  
 GTTGTAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
 ACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTA.

**1.3.6 Khảo sát chuyển hóa ammonia của 10 chủng vi khuẩn AOB****Bảng 1.6** Hiệu suất chuyển hóa  $\text{NH}_4^+$  của 10 dòng vi khuẩn AOB

Dòng vi khuẩn	Hiệu suất chuyển hóa $\text{NH}_4^+$ (%)						
	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày	7 ngày
KL2	18,2 <sup>b</sup> ± 0,01	15,51 <sup>g</sup> ± 0,02	26,8 <sup>f</sup> ± 0,01	30,9 <sup>j</sup> ± 0,06	67,28 <sup>f</sup> ± 0,1	73,17 <sup>d</sup> ± 0,07	78,38 <sup>f</sup> ± 0,14
KL10	12,9 <sup>d</sup> ± 0,11	17,51 <sup>f</sup> ± 0,2	25,86 <sup>g</sup> ± 0,05	36,53 <sup>h</sup> ± 0,06	62,05 <sup>h</sup> ± 0,18	69,43 <sup>e</sup> ± 0,11	78,23 <sup>fg</sup> ± 0,16
KL11	11,57 <sup>e</sup> ± 0,08	20,84 <sup>c</sup> ± 0,1	27,29 <sup>f</sup> ± 0,06	34,45 <sup>i</sup> ± 0,13	76,41 <sup>d</sup> ± 0,21	64,86 <sup>f</sup> ± 0,09	77,93 <sup>g</sup> ± 0,1
KL14	15,62 <sup>c</sup> ± 0,2	17,46 <sup>f</sup> ± 0,2	35,07 <sup>e</sup> ± 0,06	37,94 <sup>g</sup> ± 0,27	57,25 <sup>i</sup> ± 0,06	62,83 <sup>g</sup> ± 0,03	79,93 <sup>e</sup> ± 0,09
KL15	10,34 <sup>f</sup> ± 0,05	19,13 <sup>d</sup> ± 0,22	37,80 <sup>d</sup> ± 0,08	39,07 <sup>f</sup> ± 0,14	71,53 <sup>e</sup> ± 0,23	75,63 <sup>c</sup> ± 0,20	83,87 <sup>c</sup> ± 0,01
KL21	11,21 <sup>e</sup> ± 0,1	18,51 <sup>e</sup> ± 0,1	25,73 <sup>g</sup> ± 0,19	41,35 <sup>e</sup> ± 0,07	55,23 <sup>j</sup> ± 0,33	72,62 <sup>d</sup> ± 0,22	80,91 <sup>d</sup> ± 0,04
KL26	15,56 <sup>c</sup> ± 0,17	35,12 <sup>b</sup> ± 0,1	66,45 <sup>c</sup> ± 0,21	90,31 <sup>c</sup> ± 0,1	95,23 <sup>c</sup> ± 0,16	95,19 <sup>b</sup> ± 0,15	96,51 <sup>b</sup> ± 0,12
KL30	30,51 <sup>a</sup> ± 0,03	45,33 <sup>a</sup> ± 0,22	75,56 <sup>a</sup> ± 0,05	97,71 <sup>a</sup> ± 0,21	97,83 <sup>a</sup> ± 0,02	97,68 <sup>a</sup> ± 0,18	97,65 <sup>a</sup> ± 0,17
KL33	30,53 <sup>a</sup> ± 0,15	45,28 <sup>a</sup> ± 0,06	70,87 <sup>b</sup> ± 0,06	96,20 <sup>b</sup> ± 0,28	95,50 <sup>b</sup> ± 0,2	97,10 <sup>a</sup> ± 0,13	97,79 <sup>a</sup> ± 0,10
KL35	15,24 <sup>c</sup> ± 0,06	17,51 <sup>f</sup> ± 0,18	35,08 <sup>e</sup> ± 0,2	50,65 <sup>d</sup> ± 0,17	64,62 <sup>g</sup> ± 0,24	75,83 <sup>c</sup> ± 0,08	80,35 <sup>e</sup> ± 0,01

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**1.4 Phân lập, định danh vi khuẩn NOB và khảo sát khả năng chuyển hóa nitrite của nhóm vi khuẩn****1.4.1 Thành phần môi trường**

Môi trường nitrite – calcium – carbonate cho phân lập vi khuẩn chuyển hóa nitrite dựa trên phương pháp của Ehrlich, 1975

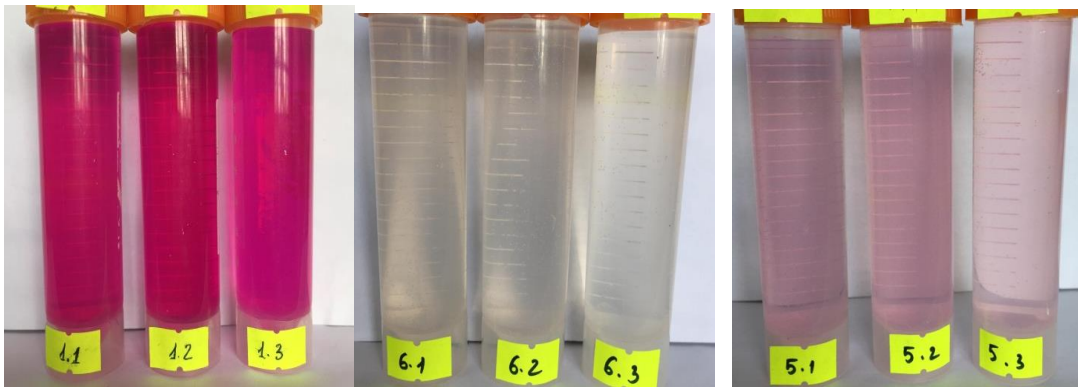
NaNO <sub>2</sub>	0,005g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
NaCl	0,3g
CaCO <sub>3</sub>	1g
CaCl <sub>2</sub>	0,3g
pH = 8	

**Môi trường nuôi tăng sinh** cho vi khuẩn chuyển hóa nitrite dựa trên phương pháp (Aleem và Alexande, 1960).

NaNO <sub>2</sub>	0,3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,175g
NaCl	0,1g
KHCO <sub>3</sub>	1,5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,35μg
Agar	15g

#### 1.4.2 Phân lập và định danh nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite



**Hình 1.9** Sự hiện diện của vi khuẩn NOB trong mẫu bùn  
Ghi chú: trắng, hồng (+), đỏ (-)

**Bảng 1.7** Mật độ vi khuẩn của nhóm NOB trong mẫu bùn

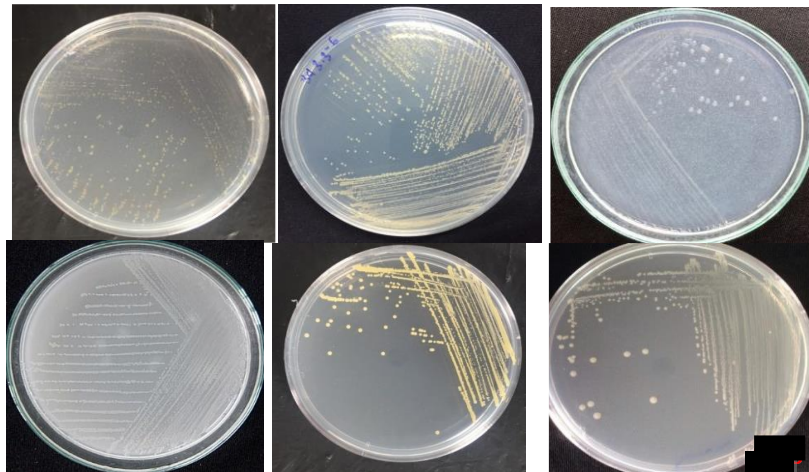
STT	Ký hiệu mẫu	Kết quả (MPN/g)	STT	Ký hiệu mẫu	Kết quả (MPN/g)
1	CKT	4,6x10 <sup>4</sup>	12	TKT	2,8x10 <sup>3</sup>
2	C <sub>1</sub>	4,6x10 <sup>2</sup>	13	T <sub>1</sub>	7,5x10 <sup>3</sup>
3	C <sub>2</sub>	1,1x10 <sup>5</sup>	14	T <sub>2</sub>	9,3x10 <sup>3</sup>
4	C <sub>3</sub>	4,3x10 <sup>3</sup>	15	T <sub>3</sub>	2,8x10 <sup>3</sup>
5	C <sub>4</sub>	2,4x10 <sup>4</sup>	16	T <sub>4</sub>	4,3x10 <sup>3</sup>
6	C <sub>5</sub>	1,5 x 10 <sup>2</sup>	17	T <sub>5</sub>	4,6x10 <sup>4</sup>
7	C <sub>6</sub>	4,3 x 10 <sup>2</sup>	18	T <sub>6</sub>	0,92 x 10 <sup>2</sup>
8	C <sub>7</sub>	2,4 x 10 <sup>2</sup>	19	T <sub>7</sub>	1,1 x 10 <sup>4</sup>
9	C <sub>8</sub>	2,0 x 10 <sup>3</sup>	20	T <sub>8</sub>	2,1 x 10 <sup>2</sup>
10	C <sub>9</sub>	0,92 x10 <sup>3</sup>	21	T <sub>9</sub>	2,0 x 10 <sup>3</sup>
11	C <sub>10</sub>	2,0 x 10 <sup>3</sup>	22	T <sub>10</sub>	2,2 x 10 <sup>2</sup>

**Bảng 1.8** Khả năng chuyển hóa NO<sub>2</sub><sup>-</sup> của các chủng vi khuẩn NOB

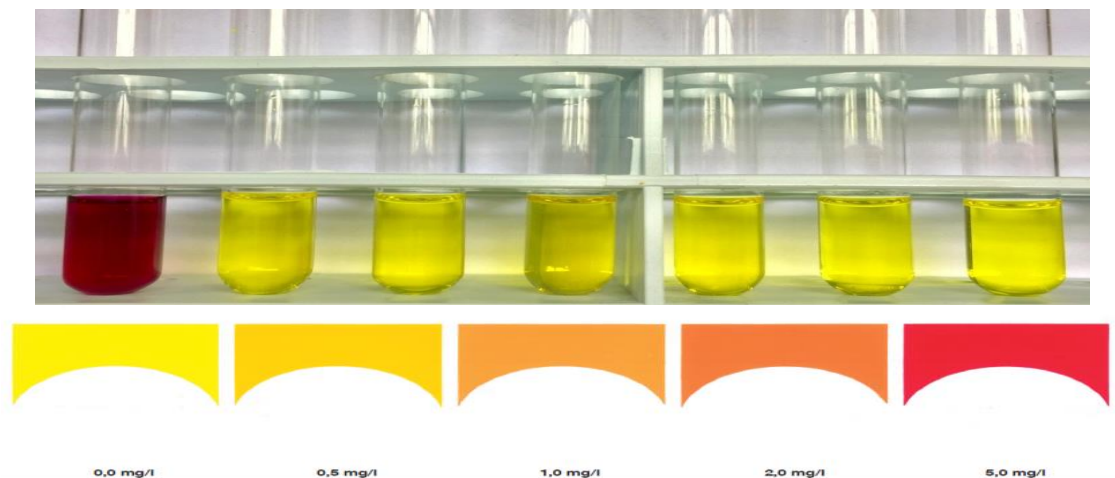
Dòng	Chuyển hóa NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Dòng	Chuyển hóa NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
CKC	++++	C <sub>9</sub> /4	++
C <sub>1</sub> /2	+++	C <sub>10</sub>	++++
C <sub>1</sub> /3	+	TKT	++++
C <sub>2</sub> /1	++++	T <sub>1</sub>	++++

<b>C<sub>2</sub>/2</b>	++++	<b>T<sub>2</sub>/1</b>	+
<b>C<sub>2</sub>/3</b>	++	<b>T<sub>2</sub>/2</b>	++++
<b>C<sub>2</sub>/4</b>	+	<b>T<sub>3</sub>/1</b>	++++
<b>C<sub>3</sub>/1</b>	++++	<b>T<sub>3</sub>/2</b>	++
<b>C<sub>4</sub>/2</b>	++++	<b>T<sub>3</sub>/3</b>	+++
<b>C<sub>4</sub>/3</b>	++	<b>T<sub>4</sub>/1</b>	++++
<b>C<sub>5</sub>/1</b>	+++	<b>T<sub>4</sub>/2</b>	+
<b>C<sub>5</sub>/3</b>	+++	<b>T<sub>5</sub>/2</b>	++
<b>C<sub>5</sub>/5</b>	+	<b>T<sub>5</sub>/3</b>	++++
<b>C<sub>6</sub>/1</b>	+	<b>T<sub>6</sub></b>	+
<b>C<sub>6</sub>/2</b>	+++	<b>T<sub>7</sub>/1</b>	+
<b>C<sub>7</sub></b>	++	<b>T<sub>7</sub>/3</b>	++++
<b>C<sub>8</sub>/1</b>	++++	<b>T<sub>8</sub>/1</b>	++
<b>C<sub>8</sub>/4</b>	+	<b>T<sub>8</sub>/2</b>	++
<b>C<sub>9</sub>/1</b>	++++	<b>T<sub>9</sub></b>	++++
<b>C<sub>9</sub>/3</b>	++	<b>T<sub>10</sub></b>	++++

Ghi chú: (+) rất yếu, (++) yếu, (+++) vừa, (++++) mạnh


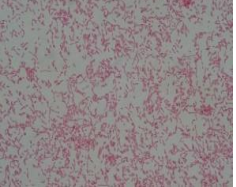

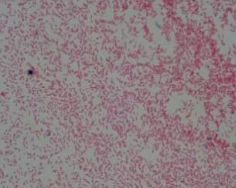
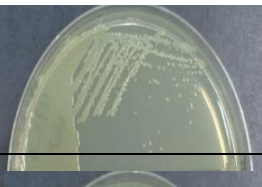
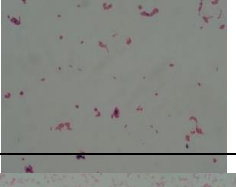

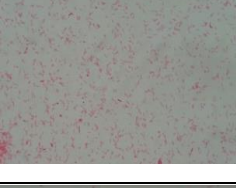











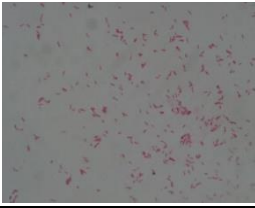

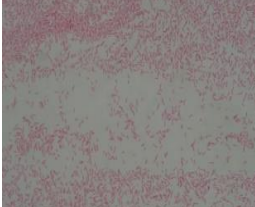

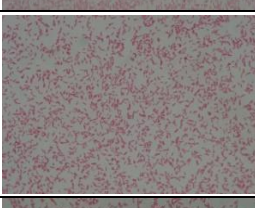
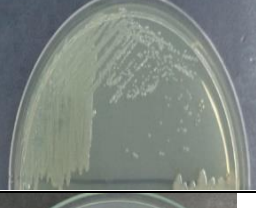
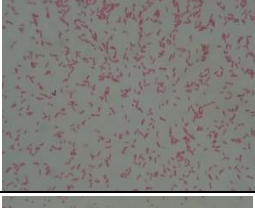
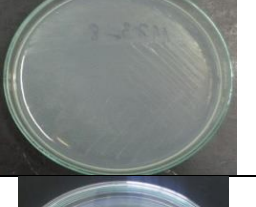
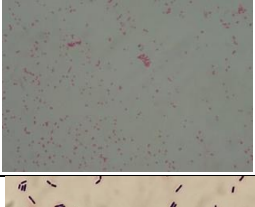



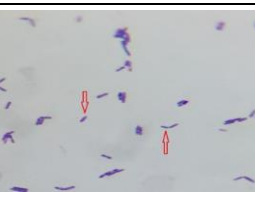


**Hình 1.10** Một số khuẩn lạc NOB phân lập tại Vịnh Xuân Đài



**Hình 1.11** Định tính khả năng chuyển hóa nitrite của chủng vi khuẩn NOB.

**Bảng 1.9** Phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn NOB

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 <sub>2</sub> /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 <sub>2</sub> /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 <sub>3</sub> /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 <sub>4</sub> /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	C <sub>8</sub> /1			Khuẩn lạc tròn, lồi, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram dương, di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%
7	C <sub>9</sub> /1			Khuẩn lạc lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram dương, sinh bào tử, di động, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%
8	C <sub>10</sub>			Khuẩn lạc màu trắng trong. Tế bào hình que, gram dương, sinh bào tử, di động, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.

9	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%
10	T <sub>1</sub>			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
11	T <sub>2/2</sub>			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%
12	T <sub>3/1</sub>			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%
13	T <sub>4/1</sub>			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%
14	T <sub>5/3</sub>			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram dương, sinh bào tử, di động, sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%
15	T <sub>7/3</sub>			Khuẩn lạc màu đỏ cam, Tế bào hình que, gram dương, sinh bào tử, không di động, sinh bào tử, catalase (+), oxidase (-), phát triển trên môi trường NaCl 3%
16	T <sub>9</sub>			Khuẩn lạc màu đỏ cam, Tế bào hình que, gram dương, sinh bào tử, không di động, sinh bào tử, catalase (+), oxidase (-), phát triển trên môi trường NaCl 3%

### 1.4.3 Kết quả giải trình tự

#### Kết quả giải trình tự dòng TKT

AGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCT  
TGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTGC  
TGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGC

AGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCG  
GGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA  
CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT  
AAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCTGGTTGGGATGACGGTA  
CCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGT GC

**Kết quả giải trình tự dòng CKT**

TCAGGATGAACGCTAGCGGGAGGCCTAACACATGCAAGCCGAGCGGTAGAGATCTTT  
CGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGCCTTTATCAGG  
GGGATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAATACCCATAATATATTGAGTGGCATCACTTA  
ATATTGAAAAGTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTGAG  
GTAACGGCTCACCAAGTCTGCGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTATCCCCACACT  
GGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATATTGGACAA  
TGGGTGCGAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAA  
ACTTCTTTTGTATAGGGATAAACCTACTCTCGTGAGAGTAGCTGAAGGTACTATACGA  
ATAAGCACCGGCTAACTCC

**Kết quả giải trình tự dòng C<sub>2</sub>/2**

AGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCT  
TGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTGC  
TGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACTACGGGTGAAAGC  
AGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCG  
GGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA  
CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT  
AAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCGGTTGGGATGACGGTA  
CCCAAAGAATAAGCACCGGC

**Kết quả giải trình tự dòng C<sub>4</sub>/2**

TGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCA  
GCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGG  
AATCTACTCTGTCTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACC  
TACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGAT  
TAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAG  
GATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTGGGTGAAGAA  
GGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGG AAAGAAATCCA

**Kết quả giải trình tự dòng C<sub>3</sub>/1**

TGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCA  
GCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGG  
AATCTACTCTGTCTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACC  
TACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGAT  
TAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAG  
GATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTGGGTGAAGAA  
GGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGG AAAGAAATCCA

**Kết quả giải trình tự dòng T<sub>3</sub>/1**

TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGT  
CTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTCTGT  
GGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGCTCTGAGGATGAAAGCGG  
GGGACCTTCGGGCCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGG  
ATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACT  
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAA



TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTGTAAA  
 CTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTCCTTCTAATACAGGGGGCCCATGACGGTACCG  
 TAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTG CCAGAGCCCCGCGGTAAA

**Kết quả giải trình tự dòng T<sub>2</sub>/2**

CTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCAC  
 AGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATC  
 TACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACG  
 GGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC GCGATTGAATGAGCCGATGTCCGATTAGC  
 TAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATG  
 ATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG  
 AATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTGGGTGAAGAAGGCC  
 TTCGGGTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAA TCCA

**Kết quả giải trình tự dòng T<sub>4</sub>/1**

GATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAG  
 ATGAGGTGCTTGCACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGC  
 CTATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGA  
 GAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC GCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAG  
 TTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC  
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA  
 TTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTATG  
 GTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGG  
 ACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAA CTCTGTG

**Kết quả giải trình tự dòng T<sub>1</sub>**

TTGGAGAGTTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAA  
 GTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAG  
 GAATACATCGGAATCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATAC  
 CGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC GCGATTGAATGAGC  
 CGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCT  
 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG  
 AGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGT  
 GGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCCGGC  
 TAATACCTGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAG  
 CAGCCCCGCGTAA

**Kết quả giải trình tự dòng C<sub>2</sub>/1**

TCAGGATGAACGCTAGCGGGAGGCCTAACACATGCAAGCCGAGCGGTAGAGATCTTT  
 CGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGCTGTGCAACCTGCCTTTATCAGG  
 GGGATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAATACCCATAATATATTGAGTGGCATCACTTA  
 ATATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTGAG  
 GTAACGGCTCACCAAGTCTGCGATCTTAGGGGGCCTGAGAGGGTATCCCCACACT  
 GGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATATTGGACAA  
 TGGGTGCGAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTGTAA  
 ACTTCTTTTGTATAGGGATAAACCTACTCTCGTGAGAGTAGCTGAAGGTACTATACGA  
 ATAAGCACCGGCTAACTCC

**Kết quả giải trình tự dòng C<sub>8</sub>/1**

TGGGGCCCTTCTTCTGAGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTA  
 CAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTGCCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGT  
 GCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTG  
 GCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGAAGCATTACCTCACCA  
 ACAAGCTGATAGGCCGCGAGTCCATCCCCACCGATAAATCTTTCAACAACCCACCAT  
 GCAGTAGGAAGTCATATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCCGGGCTTATCCCAGAGTCGG  
 GGGCAGGTTACTCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCACTAATCCACCCTGCAAGCAGGG

CTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGAA  
CAAACCTCTCTAA.

**Kết quả giải trình tự dòng C<sub>9/1</sub>**

GGTGGGGGGGGCGTGCCTATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTA  
TGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGA  
TAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGAT  
TGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT  
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTC  
GTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGG  
TACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGGTAATAAAA.

**Kết quả giải trình tự dòng T<sub>5/3</sub>**

TCGGGGGGGGGGTGA AAAAATAATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTC  
TATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGG  
GATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATG  
ATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT  
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGG  
TCGTA AA ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGAC  
GGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAAAA

**Kết quả giải trình tự dòng C<sub>10</sub>**

AGGGGGGGGCTGCCTATACTGCAAGTCGAGCGCAGGAAGTTATCTGATCCTCTTTTAG  
AGGTGACGATAATGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCT  
GTAAGACTGGGATAACTCGTGGAACGCGAGCTAATACCGGATAACACTTTTCATCTC  
CTGATGAGAAGTTGAAAGGCGGCTTTTGCTGTCACTTACAGATGGGCCTGCGGCGCAT  
TAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG  
GTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCATAGTAACTGATGG  
CACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
ATAAA.

**Kết quả giải trình tự dòng T<sub>7/3</sub>**

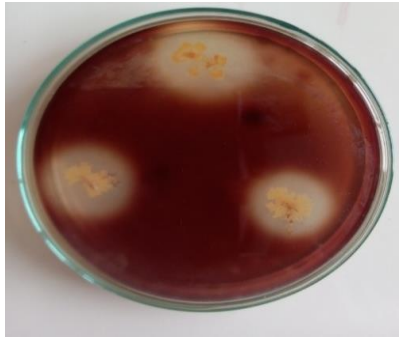
ATGGGCGGCGTGCTTACCATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATT  
AGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTG  
GGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCTCGGGATGCATGTTCCGGGGTGGAAAGG  
TTTTCCGGTGCAGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCAC  
CAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC  
CTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACT  
ACCGACGAAGCGCAAGTGACGGTAGGTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCA  
GCAGCCGCGGTAAAAAAGTGACGGTAGGTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATAA.

**Kết quả giải trình tự dòng T<sub>9</sub>**

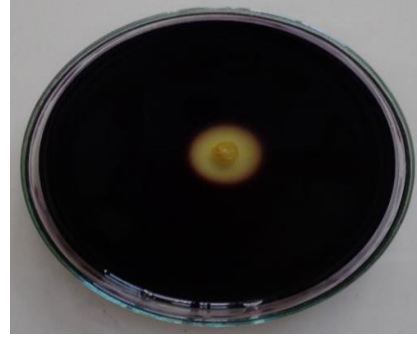
ACGGGGCGCGGTACTAACCTGCAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTA  
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGG  
GAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCTTCTGCCCGATGGTGGGGGGTGGAAAGGTT  
TCCGGTGCAGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCACCA  
AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT

GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAC  
CGACGAAGCGCAAGTGACGGTAGGTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATAA.

**1.4.4 Kết quả sinh hóa để xác định 2 chủng vi khuẩn C<sub>9</sub>/1, T<sub>5</sub>/3 thuộc chi *Bacillus* sp. (khóa phân loại Bergey).**



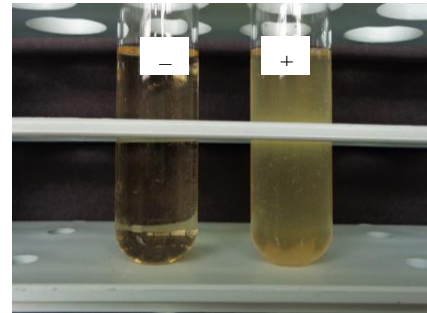
Thủy phân Casein



Thủy phân tinh bột

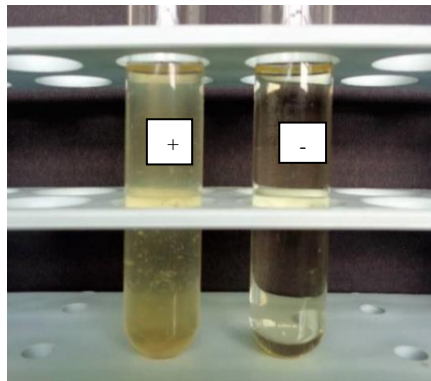


Phản ứng đồng hóa Citrate



Vi khuẩn phát triển ở nồng độ 6,5% NaCl

**1.4.5. Kết quả sinh hóa xác định các chủng vi khuẩn TKT, T<sub>2</sub>/2, C<sub>2</sub>/2, C<sub>4</sub>/2, C<sub>3</sub>/1 và T<sub>1</sub>**



Vi khuẩn C<sub>3</sub>/1 và T<sub>1</sub> phát triển ở nồng độ muối 4,5%, 42°C trên môi trường lỏng và môi trường thạch

**1.4.6 Khảo sát chuyên hóa nitrite của 11 chủng vi khuẩn NOB**

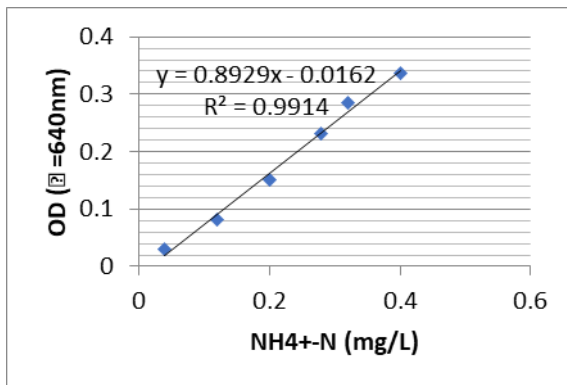
**Bảng 1.10** Hiệu suất chuyển hóa nitrite của 11 dòng vi khuẩn NOB

Dòng vi khuẩn	Hiệu suất chuyển hóa NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (%)					
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
CKT	16,90 <sup>d</sup> ±0,01	34,26 <sup>d</sup> ±0,01	64,87 <sup>c</sup> ±0,03	89,77 <sup>bc</sup> ±0,08	94,56 <sup>bc</sup> ±0,02	96,62 <sup>abc</sup> ±0,01
C <sub>2</sub> /1	9,80 <sup>f</sup> ±0,08	34,64 <sup>cd</sup> ±0,46	64,95 <sup>c</sup> ±1,16	87,06 <sup>de</sup> ±1,14	96,86 <sup>ab</sup> ±0,67	97,99 <sup>a</sup> ±0,58
C <sub>2</sub> /2	15,53 <sup>d</sup> ±0,58	24,67 <sup>e</sup> ±0,27	61,90 <sup>d</sup> ±0,58	87,94 <sup>cd</sup> ±0,57	96,16 <sup>ab</sup> ±0,57	96,16 <sup>abc</sup> ±0,58
C <sub>3</sub> /1	9,52 <sup>f</sup> ±0,06	19,96 <sup>f</sup> ±0,57	56,64 <sup>e</sup> ±0,57	83,10 <sup>fg</sup> ±0,46	90,76 <sup>e</sup> ±0,58	95,31 <sup>bc</sup> ±0,60
C <sub>4</sub> /2	12,25 <sup>e</sup> ±0,69	26,54 <sup>e</sup> ±0,57	60,34 <sup>d</sup> ±0,66	85,07 <sup>ef</sup> ±0,53	91,65 <sup>de</sup> ±0,57	95,15 <sup>bc</sup> ±0,57

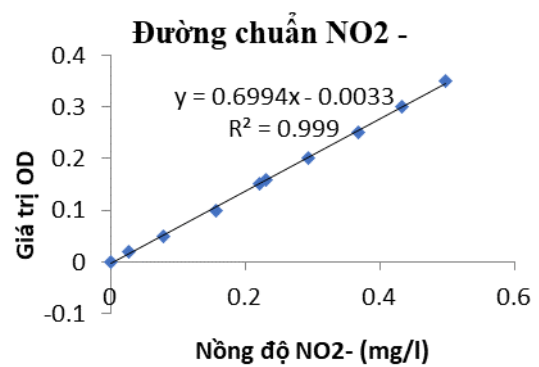
TKT	27,73 <sup>b</sup> ±0,57	35,58 <sup>cd</sup> ±1,15	74,86 <sup>b</sup> ±0,57	89,19 <sup>bcd</sup> ±0,48	93,58 <sup>cd</sup> ±0,81	95,73 <sup>bc</sup> ±0,58
T <sub>1</sub>	13,14 <sup>c</sup> ±0,48	25,59 <sup>e</sup> ±0,21	56,25 <sup>c</sup> ±0,57	82,07 <sup>e</sup> ±0,38	92,90 <sup>cde</sup> ±0,27	95,05 <sup>c</sup> ±0,60
T <sub>2/2</sub>	21,39 <sup>c</sup> ±0,68	64,86 <sup>a</sup> ±0,57	80,73 <sup>a</sup> ±1,17	94,76 <sup>a</sup> ±0,58	97,52 <sup>a</sup> ±0,23	98,21 <sup>a</sup> ±0,46
T <sub>3/1</sub>	31,97 <sup>a</sup> ±0,06	36,57 <sup>c</sup> ±0,06	81,19 <sup>a</sup> ±0,05	94,30 <sup>a</sup> ±0,35	96,60 <sup>ab</sup> ±0,57	97,29 <sup>ab</sup> ±0,23
T <sub>4/1</sub>	17,96 <sup>d</sup> ±0,58	52,52 <sup>b</sup> ±0,06	76,17 <sup>b</sup> ±0,46	91,41 <sup>b</sup> ±0,29	93,91 <sup>bc</sup> ±0,57	96,18 <sup>abc</sup> ±0,17
T <sub>9</sub>	45,51 <sup>a</sup> ±0,75	69,84 <sup>a</sup> ±1,5	77,52 <sup>b</sup> ±0,1	82,63 <sup>fg</sup> ±1,4	89,84 <sup>f</sup> ±0,61	95,01 <sup>bc</sup> ±0,6

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

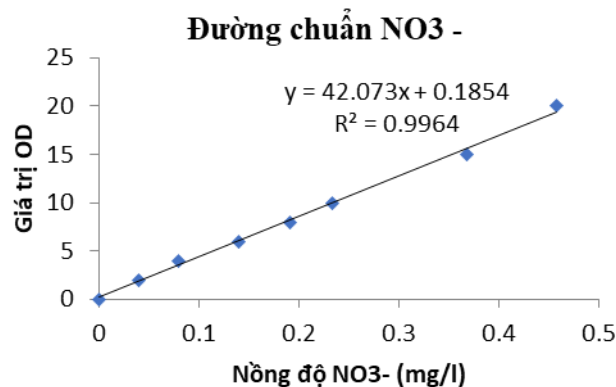
### 1.5. Xây dựng đường chuẩn ammonia, nitrite, nitrate



Hình 1.12 Đường chuẩn ammonia



Hình 1.13 Đường chuẩn nitrite



Hình 1.14 Đường chuẩn nitrate

#### ➤ Phương pháp phân tích ammonia (PHENAT)

- Dung dịch phenol: trộn 11,1 ml phenol ( $\geq 89\%$ ) với rượu etylic (95%) đến 100 ml. Pha dung dịch hàng tuần.
- Dung dịch natri nitroprusit: hòa tan 0,5 g natri nitroprusit trong nước cất và định mức đến 100 ml. Bảo quản trong chai màu hổ phách hay nâu.
- Dung dịch citrate: hòa tan 200 g natri citrate và 10 g NaOH trong nước cất, định mức đến 1000 ml.
- Dung dịch natri hypoclorit (NaOCl): sử dụng thuốc tẩy thương mại 5%. Dung dịch bền trong hai tháng.
- Dung dịch oxi hóa: trộn 100 ml dung dịch citrate với 25 ml dung dịch natri hypoclorit. Chuẩn bị dung dịch hàng ngày.
- Dung dịch gốc ammoni: hòa tan 2,972 g NH<sub>4</sub>Cl khan (đã sấy khô ở 100°C) trong nước và pha loãng đến 1000 ml. 1,0 ml dung dịch này chứa 1 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (nồng độ 1000 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l).
- Dung dịch ammoni trung gian 1: 10,0 ml dung dịch ammoni gốc pha loãng đến 100 ml. 1,0 ml dung dịch này chứa 0,1 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (nồng độ 100 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l).

- Dung dịch ammoni trung gian 2: 10,0 ml dung dịch ammoni trung gian 1 pha loãng đến 100 ml. 1,0 ml dung dịch này chứa 0,01 mg  $\text{NH}_4^+$  (nồng độ 10 mg  $\text{NH}_4^+$ /l).
- Dung dịch ammoni làm việc: 10 ml dung dịch ammoni trung gian 2 định mức 50 ml. 1,0 ml này chứa 0,002 mg  $\text{NH}_4^+$  (nồng độ 2 mg  $\text{NH}_4^+$ /l).

#### Quy trình phân tích

Lấy 25 ml mẫu cho vào bình định mức dung tích 50 ml. Thêm 1 ml dung dịch phenol, 1 ml dung dịch natri nitroprusit, 2,5 ml dung dịch oxi hóa (trộn lẫn đều dung dịch sau mỗi lần thêm thuốc thử), thêm nước cất đến vạch mức và trộn đều. Để trong bóng tối, ở nhiệt độ phòng (22 - 27°C) ít nhất 1 giờ. Đo mật độ quang ở bước sóng 640 nm với dung dịch mẫu trắng làm dung dịch so sánh. Màu ổn định trong 24 giờ.

Nồng độ  $\text{NH}_4^+$  trong các mẫu được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn có dạng  $y = ax + b$  được xây dựng dựa trên dãy nồng độ  $\text{NH}_4^+$  chuẩn có giới hạn từ 0,00 – 0,40 mg/l như bảng 12.

Thành phần và nồng độ các dung dịch xây dựng đường chuẩn

STT	1	2	3	4	5	6	7
Thể tích dd ammoni làm việc (ml)	0	1	3	5	7	8	10
Thể tích dd phenol (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Thể tích dd natrinotroprusit (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Thể tích dd oxi hóa (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Thể tích nước cất (ml)				Vừa đủ 50 ml			
Nồng độ ammoni (mg $\text{NH}_4^+$ /l)	0,00	0,04	0,12	0,2	0,28	0,32	0,4

Cách xác định nồng độ ammonia trong các mẫu chuẩn được tiến hành như trên.

#### ➤ Phương pháp phân tích nitrite ( phương pháp NATHYLAMINE)

- Dung dịch EDTA: hòa tan 0,5 g Disodium Ethylendiamine Tetra Acetate Dihydrate trong nước cất và định mức đến vạch 100 ml.
- Acid Sulfanilic: hòa tan 0,6 g Acid Sulfanilic trong 70 ml nước cất đã được đun nóng. Để nguội, thêm 20 ml HCl đậm đặc, pha loãng đến vạch 100 ml.
- Dung dịch Naphthylamin Hydrochloride: hòa tan 0,6 g 1 - Naphthylamin hydrochloride trong 50 ml nước cất đã thêm 1 ml HCl đậm đặc, lắc đều và thêm nước cất đến vạch 100 ml.
- Chú ý: Thuốc thử có thể nhạt màu và trầm hiện sau 1 tuần, ta có thể lọc và vẫn có thể dùng được. Nên bảo quản trong tủ lạnh. Sử dụng nên cẩn thận vì thuốc thử này có độc tính, do đó tránh hút bằng miệng và tránh dính vào da.
- Dung dịch đệm Sodium acetate: Hòa tan 16,4 g Sodium acetate ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) khan hay 27,2 g  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  trong nước cất và pha loãng đến 100 ml.
- Dung dịch trữ Nitrite: cân chính xác 0,3749 g  $\text{NaNO}_2$  khan, hòa tan với nước cất thành 1000 ml (1 ml = 250  $\mu\text{g NO}_2^-$ ). Để bảo quản thêm 1ml  $\text{CHCl}_3$ .
- Dung dịch chuẩn trung gian (1 ml = 50  $\mu\text{g NO}_2^-$ ): Lấy chính xác 50 ml dung dịch trữ cho vào bình định mức 250 ml, pha loãng với nước cất đến vạch.
- Dung dịch chuẩn (1 ml = 5  $\mu\text{g NO}_2^-$ ): Lấy chính xác 10 ml dung dịch chuẩn trung gian cho vào bình định mức 100 ml. Pha loãng với nước cất đến vạch. Hai dung dịch 6, 7 chỉ pha khi dùng.
- Dung dịch Sulfat Zinic (10%): Hòa tan 100 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  trong nước cất, pha loãng đến 1000 ml.
- Dung dịch NaOH 6N: Hòa tan 240 g NaOH trong 500 ml nước cất và pha loãng đến 1000 ml.

Xử lý mẫu: Nếu mẫu đục hoặc màu cao, cho 1 ml dung dịch  $\text{ZnSO}_4$  (10%) vào 100 ml mẫu, khuấy đều, thêm 0,4 - 0,5 ml dung dịch NaOH để đạt pH 10,5. Khuấy đều, để yên mẫu vài phút, cặn sẽ lắng xuống đáy. Lọc hay li tâm, nếu lọc, loại bỏ 25 ml đầu tiên qua lọc.

*Quy trình phân tích*

- Lấy 50 ml mẫu đã qua xử lý và trung hòa về pH = 7,0 cho vào các ống nessler.
- Thêm vào mỗi ống nessler 1 ml dung dịch EDTA, 1 ml dung dịch acid sunfanilic. Lắc đều, pH của mẫu lúc này khoảng 1,4. Để yên 3 – 10 phút.
- Thêm vào 1 ml naphthylamine hydrochloride và 1 ml dung dịch đệm acetate. Lắc đều, pH của dung dịch lúc này khoảng 2 – 2,5. Để yên trong 10 – 30 phút. Đo mật độ quang học ở bước sóng 520 nm. Đọc và ghi nhận kết quả.

Nồng độ  $\text{NO}_2^-$  trong các mẫu được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn có dạng  $y = ax + b$  được xây dựng dựa trên dãy nồng độ  $\text{NO}_2^-$  chuẩn có giới hạn từ 0,00 – 0,35 mg/l như bảng 13.

**Thành phần và nồng độ các dung dịch xây dựng đường chuẩn**

ml dd chuẩn (1ml=5 $\mu\text{g}$ $\text{NO}_2^-$ )	0	0,2	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5
ml nước cất thêm vào	50	49,8	49,5	49	48,5	48	47,5	47	46,5
Số $\mu\text{g}$ $\text{NO}_2^-$	0	1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5
mg/l $\text{NO}_2^-$	0	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35

Cách xác định nồng độ  $\text{NO}_2^-$  trong các mẫu chuẩn được thực hiện như quy trình trên.

➤ **Phương pháp phân tích nitrate ( phương pháp SALICYLATE)**

- Dung dịch A: Sodium salicylate 0,5%: hòa tan 0,5 g Sodium salicylate vào nước cất và định mức đến 100 ml.
- Dung dịch B: Sulphuric acid 96%.
- Dung dịch C: sodium hydroxide 10 mol/l: hòa tan 400g NaOH trong nước cất và định mức đến vạch 100 ml.
- Dung dịch chuẩn: Potassium nitrate: 100 mg/l (0,1631 g  $\text{KNO}_3$  đã sấy khô ở 105°C, sau đó hòa tan trong nước cất và định mức đến 1000 ml).

*Quy trình thực hiện*

- Lấy 10 ml mẫu đã qua xử lý, cho vào hũ thủy tinh, thêm 1 ml dung dịch sodium salicylate 1%, lắc đều. Cô cạn dung dịch.
- Sau khi làm lạnh, thêm 1 ml dung dịch acid sunfuric 96%, chờ 10 phút.
- Thêm 7 ml dung dịch NaOH 10 mol/l vào các hũ thủy tinh trên, để nguội, thêm nước cất cho đủ 50 ml. Lắc đều, để yên trong 10 phút cho màu ổn định.
- Đo mật độ quang học ở bước sóng 410 nm. Đọc và ghi nhận kết quả.

Hàm lượng  $\text{NO}_3^-$  trong mẫu được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn có dạng  $y = ax + b$  được xây dựng dựa trên dãy nồng độ  $\text{NO}_3^-$  chuẩn có giới hạn từ 0,00 – 0,35 mg/l như bảng 14.

**Thành phần và nồng độ các dung dịch xây dựng đường chuẩn.**

STT	1	2	3	4	5	6	7	8
Thể tích dung dịch $\text{KNO}_3$ 100 mg/l (ml)	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	7,5	10,0
Thể tích dung dịch A (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Thể tích dung dịch B (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Thể tích dung dịch C (ml)	7	7	7	7	7	7	7	7
Thể tích nước cất (ml)	Vừa đủ 50 ml							
Nồng độ mẫu chuẩn (mg/l)	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	15,0	20,0

Cách xác định hàm lượng  $\text{NO}_3^-$  trong các mẫu chuẩn được thực hiện như quy trình trên

**1.6 Khảo sát đặc tính chuyển hóa ammonia, nitrite, nitrate và chịu mặn của các dòng vi khuẩn****Bảng 1.11** Định tính khả năng chuyển hóa nitrite và nitrate của các dòng vi khuẩn AOB

Stt	Dòng vi khuẩn	Chuyển hóa $\text{NO}_2^-$	Chuyển hóa $\text{NO}_3^-$
-----	---------------	----------------------------	----------------------------

1	<i>Bacillus sp.</i> B5	+	+
2	<i>Bacillus sp.</i> B31	+	-
3	<i>Bacillus sp.</i> B58	-	-
4	<i>Bacillus sp.</i> B68	+	-
5	<i>Bacillus sp.</i> B74	+	-
6	<i>Bacillus licheniformis</i> B85	+	+
7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> KL15	+	+
8	<i>Sphingobacterium multivorum</i> KL26	-	-
9	<i>Providencia stuartii</i> KL30	+	-
10	<i>Alcaligenes faecalis</i> KL33	+	+

(+): phản ứng dương tính; (-): phản ứng âm tính.

**Bảng 1.12** Định tính khả năng chuyển hóa ammonia và nitrate của các dòng vi khuẩn NOB

Stt	Dòng vi khuẩn	Chuyển hóa $\text{NH}_4^+$	Chuyển hóa $\text{NO}_3^-$
1	<i>Chryseobacterium gleum</i> CKT	+	+
2	<i>Chryseobacterium gleum</i> C2/1	+	-
3	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> C2/2	+	-
4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> C3/1	+	-
5	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> C4/2	+	-
6	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> TKT	+	-
7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> T1	+	+
8	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> T2/2	+	+
9	<i>Delftia lacustris</i> T3/1	+	+
10	<i>Acinetobacter junii</i> T4/1	+	-
11	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> T9	+	+

(+): phản ứng dương tính; (-): phản ứng âm tính..

**Bảng 1.13** Hiệu suất chuyển hóa  $\text{NO}_2^-$  của 4 dòng vi khuẩn AOB

ST T	Dòng vi khuẩn	Hiệu suất chuyển hóa $\text{NO}_2^-$ của 4 dòng vi khuẩn			
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày
1	<i>Bacillus sp.</i> B5	29,33 <sup>a</sup> ± 0,09	40,63 <sup>a</sup> ± 0,16	90,97 <sup>c</sup> ± 0,22	92,58 <sup>c</sup> ± 0,01
2	<i>Bacillus licheniformis</i> B85	17,98 <sup>b</sup> ± 0,01	36,45 <sup>b</sup> ± 0,09	94,98 <sup>a</sup> ± 0,11	96,97 <sup>b</sup> ± 0,13
3	<i>Pseudomonas stutzeri</i> KL15	5,46 <sup>d</sup> ± 0,03	24,02 <sup>c</sup> ± 0,08	94,18 <sup>b</sup> ± 0,08	99,06 <sup>a</sup> ± 0,02
4	<i>Alcaligenes faecalis</i> KL33	8,76 <sup>c</sup> ± 0,12	26,25 <sup>d</sup> ± 0,06	87,36 <sup>d</sup> ± 0,09	90,53 <sup>d</sup> ± 0,07

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 1.14** Hiệu suất chuyển hóa  $\text{NO}_3^-$  của 4 dòng vi khuẩn AOB và 4 dòng NOB

STT	Dòng vi khuẩn	Hiệu suất chuyển hóa $\text{NO}_3^-$ 8 dòng vi khuẩn.			
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày
1	<i>Bacillus sp.</i> B5	7,32 <sup>g</sup> ± 0,07	40,63 <sup>c</sup> ± 0,05	63,48 <sup>d</sup> ± 0,05	63,87 <sup>f</sup> ± 0,05
2	<i>Bacillus licheniformis</i> B85	12,46 <sup>d</sup> ± 0,17	43,87 <sup>b</sup> ± 0,09	89,36 <sup>b</sup> ± 0,12	89,63 <sup>b</sup> ± 0,14
3	<i>Pseudomonas stutzeri</i> KL15	9,67 <sup>f</sup> ± 0,1	44,35 <sup>b</sup> ± 0,25	98,07 <sup>a</sup> ± 0,04	98,02 <sup>a</sup> ± 0,01
4	<i>Alcaligenes faecalis</i> KL33	16,25 <sup>b</sup> ± 0,02	36,45 <sup>e</sup> ± 0,02	51,32 <sup>f</sup> ± 0,01	52,12 <sup>g</sup> ± 0,02
5	<i>Chryseobacterium gleum</i> CKT	6,59 <sup>h</sup> ± 0,05	28,37 <sup>g</sup> ± 0,12	42,61 <sup>g</sup> ± 0,08	45,36 <sup>h</sup> ± 0,04
6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> T1	10,43 <sup>e</sup> ± 0,04	37,46 <sup>d</sup> ± 0,22	63,42 <sup>d</sup> ± 0,07	64,29 <sup>e</sup> ± 0,12

7	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> T <sub>2/2</sub>	13,84 <sup>c</sup> ± 0,03	32,78 <sup>f</sup> ± 0,1	60,29 <sup>e</sup> ± 0,06	65,45 <sup>d</sup> ± 0,1
8	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	17,41 <sup>a</sup> ± 0,02	57,20 <sup>a</sup> ± 0,07	80,97 <sup>c</sup> ± 0,13	81,24 <sup>c</sup> ± 0,06

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 1.15** Hiệu suất chuyển hóa NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của 4 dòng vi khuẩn NOB

STT	Dòng vi khuẩn	Hiệu suất chuyển hóa NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> của 4 dòng vi khuẩn					
		1	2	3	4	5	6
		ngày	ngày	ngày	ngày	ngày	ngày
1	<i>C. gleum</i> CKT	11,37 <sup>d</sup> ± 0,06	25,68 <sup>d</sup> ± 0,08	37,88 <sup>c</sup> ± 0,01	42,68 <sup>d</sup> ± 0,15	63,39 <sup>c</sup> ± 0,1	64,01 <sup>c</sup> ± 0,11
2	<i>S.maltophilia</i> T <sub>1</sub>	13,153 <sup>c</sup> ± 0,12	26,52 <sup>c</sup> ± 0,05	35,86 <sup>d</sup> ± 0,05	46,81 <sup>c</sup> ± 0,04	60,61 <sup>d</sup> ± 0,12	59,12 <sup>d</sup> ± 0,07
3	<i>S. pavanii</i> T <sub>2/2</sub>	16,23 <sup>b</sup> ± 0,12	27,48 <sup>d</sup> ± 0,17	38,39 <sup>b</sup> ± 0,02	47,92 <sup>b</sup> ± 0,04	70,23 <sup>b</sup> ± 0,1	69,34 <sup>b</sup> ± 0,02
4	<i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	28,62 <sup>a</sup> ± 0,18	32,32 <sup>a</sup> ± 0,02	56,87 <sup>a</sup> ± 0,06	80,93 <sup>a</sup> ± 0,02	86,21 <sup>a</sup> ± 0,02	85,87 <sup>a</sup> ± 0,07

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 1.16** Khảo sát khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn AOB

STT	Dòng vi khuẩn	OD <sub>600nm</sub>					
		Nồng độ muối NaCl (%)					
		2%	3%	4%	5%	6%	7%
1	<i>Bacillus sp.</i> B5	0,99±0,01	0,99±0,01	0,91±0,03	0,78±0,02	0,58±0,01	0,32±0,01
2	<i>Bacillus licheniformis</i> B85	0,95±0,01	0,95±0,01	0,86±0,02	0,69±0,03	0,42±0,04	0,27±0,02
3	<i>Pseudomonas stutzeri</i> KL15	0,89±0,01	0,89±0,01	0,8±0,03	0,52±0,03	0,36±0,03	0,15±0,02
4	<i>Alcaligenes faecalis</i> KL33	0,92±0,01	0,92±0,01	0,75±0,03	0,67±0,03	0,34±0,03	0,13±0,01

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 1.17** Khảo sát khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn NOB

STT	Dòng vi khuẩn	OD <sub>600nm</sub>					
		Nồng độ muối NaCl (%)					
		2%	3%	4%	5%	6%	7%
1	<i>Chryseobacterium gleum</i> CKT	0,82±0,03	0,82±0,03	0,71±0,02	0,64±0,03	0,37±0,02	0,08±0,01
2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> T <sub>1</sub>	0,98±0,01	0,98±0,01	0,76±0,03	0,58±0,04	0,39±0,02	0,26±0,04
3	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> T <sub>2/2</sub>	0,84±0,03	0,84±0,03	0,69±0,03	0,48±0,01	0,14±0,02	0,07±0,02
4	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	0,91±0,02	0,91±0,02	0,84±0,02	0,61±0,05	0,25±0,03	0,11±0,02

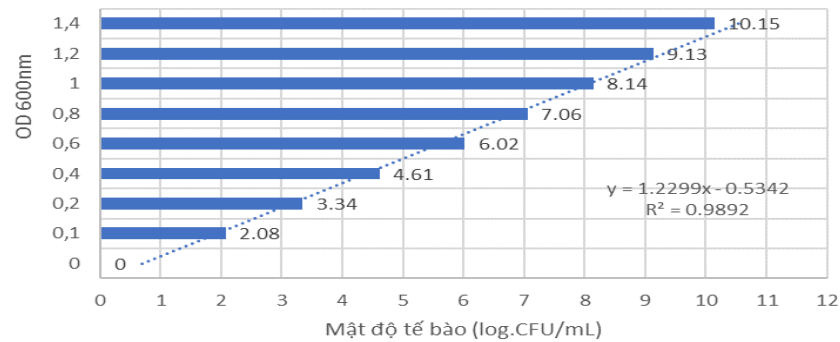
Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).



## PHỤ LỤC 2 ( NỘI DUNG 2)

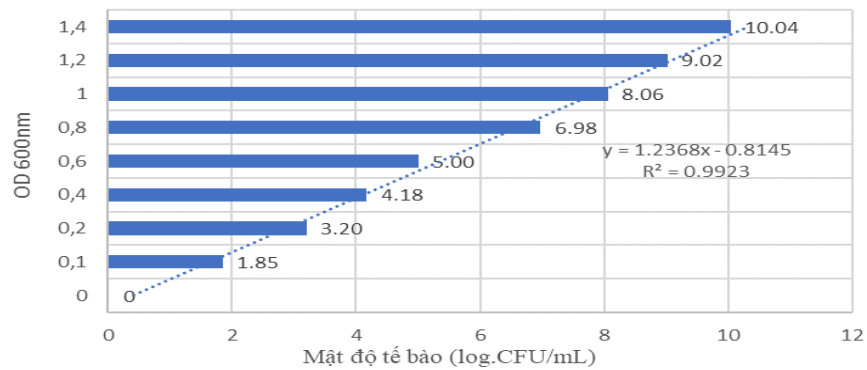
### 2.1 Đường tuyến tính mật số vi sinh vật với OD<sub>600nm</sub>

#### *Bacillus licheniformis* B85



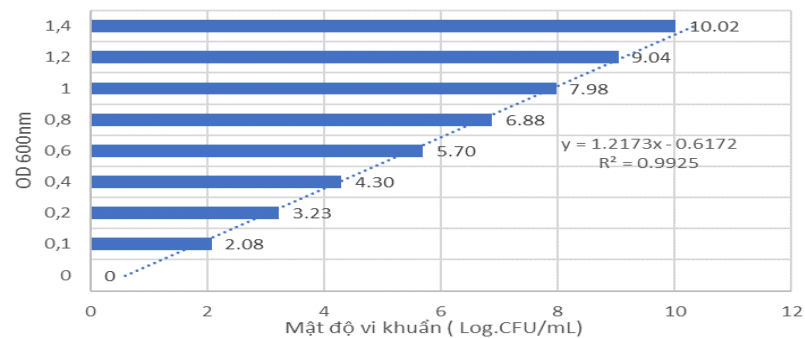
**Hình 2.1** Đường tuyến tính của vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85

#### *Pseudomonas stutzeri* KL15



**Hình 2.2** Đường tuyến tính của vi khuẩn *P. stutzeri* KL15

#### *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>



**Hình 2.3** Đường tuyến tính của vi khuẩn *R. rhodochrous* T<sub>9</sub>

### 2.2 Thành phần môi trường nhân sinh khối

#### Môi trường *Luria Bertani* (LB)

Thành phần	g/l
Peptone	10
Cao nấm men	5
NaCl	10

#### Môi trường *Nutrient Broth* (NB)

Thành phần	g/l
Cao thịt	1.5
Cao nấm men	1.5
Peptone	5
NaCl	5

**Môi trường *Tryptic soybean broth* (TSB)**

Thành phần	g/l
Tryptose	17 g
Papaic digest soybean meal	3 g
NaCl	5 g
Dextrose (Glucose)	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g

**2.3 Môi trường sản xuất lỏng**

Dựa trên thành phần môi trường TSB, đã thêm một số thành phần khoáng, cân bằng hàm lượng Carbon và glucose.

**Môi trường sản xuất *Tryptic soybean broth* (TSB)**

Thành phần	g/l
Pepton	10 g
Glucose	10 g
CaCl <sub>2</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub>	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
NaCl	1 g

**2.4 Thành phần môi trường bán rắn**

Dựa trên thành phần môi trường TSB sản xuất lỏng đã thêm một số thành phần chất rắn như cám gạo, cám bắp, cám mì, bã đậu nành là nguồn Nitrogen kỹ thuật cho sản xuất công nghiệp (Trần Thị Thanh, 2000; Nguyễn Đức Lương, 2006) vẫn giữ nguồn cacbon là glucose và các chất khoáng như môi trường lỏng đã tối ưu hóa cho dòng loài vi khuẩn. Nước được bổ sung vào khoảng 50% độ ẩm.

**Bảng 2.1** Thành phần môi trường bán rắn

Thành phần	gam
Cám gạo/cám bắp/ cám mì / bã đậu nành	980
CaCl <sub>2</sub>	0,2
NaCl	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
MgSO <sub>4</sub>	1
Glucose	20

**2.5. Tạo chế phẩm dạng lỏng****2.5.1 Khảo sát các điều kiện nhân sinh khối của các dòng vi khuẩn trên môi trường lỏng****Bảng 2.2** Ảnh hưởng của môi trường nhân sinh khối đến ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn ( log.CFU/mL)		
		Môi trường	LB	TSB
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	8,31 <sup>b</sup> ± 0,04	8,37 <sup>b</sup> ± 0,01	8,87 <sup>a</sup> ± 0,08
2	<i>B. licheniformis</i> B85	8,58 <sup>b</sup> ± 0,02	8,84 <sup>a</sup> ± 0,02	8,70 <sup>ab</sup> ± 0,13
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	8,63 <sup>ab</sup> ± 0,08	8,86 <sup>a</sup> ± 0,09	8,32 <sup>b</sup> ± 0,001

Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật độ theo môi trường nhân sinh khối của dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.3** Ảnh hưởng của mật độ giống đến nhân sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn ( log.CFU/mL)			
		Mật độ vi khuẩn	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	8,20 <sup>c</sup> ± 0,03	8,69 <sup>b</sup> ± 0,01	9,66 <sup>a</sup> ± 0,01	9,69 <sup>a</sup> ± 0,01
2	<i>B. licheniformis</i> B85	8,30 <sup>c</sup> ± 0,02	8,73 <sup>b</sup> ± 0,01	9,69 <sup>a</sup> ± 0,02	9,75 <sup>a</sup> ± 0,03

3	<i>P. stutzeri</i> KL15	8,39 <sup>c</sup> ±0,04	8,78 <sup>b</sup> ±0,01	9,66 <sup>a</sup> ±0,02	9,76 <sup>a</sup> ±0,03
---	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật độ thống kê theo mật độ giống của dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.4** Ảnh hưởng thời gian tăng sinh đến nhân sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/mL)				
		Thời gian	24 giờ	36 giờ	48 giờ	60 giờ
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	8,53 <sup>d</sup>	9,67 <sup>a</sup>	9,72 <sup>a</sup>	9,49 <sup>a</sup>	9,02 <sup>c</sup>
		± 0,02	±0,01	±0,02	±0,01	±0,01
2	<i>B.licheniformis</i> B85	8,49 <sup>c</sup>	9,70 <sup>a</sup>	9,73 <sup>a</sup>	9,09 <sup>b</sup>	8,99 <sup>b</sup>
		±0,01	±0,02	±0,02	±0,01	±0,01
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	8,74 <sup>c</sup>	9,70 <sup>a</sup>	9,78 <sup>a</sup>	9,26 <sup>b</sup>	8,70 <sup>c</sup>
		±0,02	± 0,01	± 0,02	± 0,01	± 0,03

Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật độ thống kê theo thời gian tăng sinh dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

### 2.5.2 Khảo sát các điều kiện nhân sinh khối của các dòng vi khuẩn trên môi trường sản xuất lỏng (thành phần môi trường mục 2.2)

**Bảng 2.5** Ảnh hưởng của tỷ lệ nạp giống đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn ( Log.CFU/mL)			
		Tỷ lệ nạp giống	1%	2,5%	3,5%
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	9,66 <sup>b</sup> ±0,01	9,98 <sup>a</sup> ± 0,01	9,66 <sup>b</sup> ±0,01	9,69 <sup>b</sup> ±0,01
2	<i>B.licheniformis</i> B85	9,66 <sup>b</sup> ±0,01	10,03 <sup>a</sup> ±0,01	9,69 <sup>b</sup> ± 0,03	9,75 <sup>b</sup> ±0,01
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	9,84 <sup>b</sup> ±0,07	10,07 <sup>a</sup> ±0,03	9,78 <sup>b</sup> ±0,04	9,73 <sup>b</sup> ± 0,04

Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật độ thống kê theo tỷ lệ nạp giống dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.6** Ảnh hưởng của thời gian đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn ( Log.CFU/mL)			
		Thời gian	12 giờ	24 giờ	36 giờ
1	<i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	9,66 <sup>b</sup> ±0,01	9,98 <sup>a</sup> ±0,01	10,01 <sup>a</sup> ±0,01	9,98 <sup>a</sup> ±0,01
2	<i>B.licheniformis</i> B85	9,63 <sup>b</sup> ±0,01	10,01 <sup>a</sup> ±0,01	10,03 <sup>a</sup> ±0,01	9,99 <sup>a</sup> ±0,03
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	9,75 <sup>b</sup> ±0,04	10,13 <sup>a</sup> ±0,05	10,19 <sup>a</sup> ±0,01	10,07 <sup>a</sup> ±0,03

Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật độ thống kê của thời gian theo dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.7** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn ( Log.CFU/mL)			
		Nhiệt độ	30°C	33°C	35°C
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	9,98 <sup>ab</sup> ±0,01	10,04 <sup>a</sup> ±0,01	9,91 <sup>bc</sup> ±0,01	9,85 <sup>c</sup> ±0,02
2	<i>B.licheniformis</i> B85	10,01 <sup>ab</sup> ±0,01	9,99 <sup>b</sup> ±0,01	10,07 <sup>a</sup> ±0,01	10,05 <sup>ab</sup> ±0,01
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	9,87±0,07	9,88 ±0,05	9,96±0,02	10,23±0,03

Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật độ thống kê theo nhiệt độ của dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ) ( Riêng dòng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 không có ý nghĩa thống kê vì  $p > 0,05$ , nên không thực nghiệm phân hạng).

**Bảng 2.8** Ảnh hưởng của pH đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn ( Log.CFU/mL)			
		pH	6,0	6,5	7,0
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	9,98 <sup>b</sup> ±0,01	10,05 <sup>a</sup> ±0,02	9,98 <sup>a</sup> ±0,01	9,78 <sup>c</sup> ±0,02
2	<i>B.licheniformis</i> B85	9,87 <sup>b</sup> ±0,01	9,97 <sup>a</sup> ±0,01	9,98 <sup>a</sup> ±0,02	10,03 <sup>a</sup> ±0,01
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	9,85 <sup>b</sup> ±0,01	9,82 <sup>b</sup> ±0,05	10,02 <sup>a</sup> ±0,02	9,87 <sup>b</sup> ±0,01

Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật độ thống kê theo pH của dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.9** Ảnh hưởng nguồn nitơ đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn		Mật độ vi khuẩn ( Log.CFU/mL)		
	Nguồn Nitơ	Amoni sunfat	Cao nấm men	Natri nitrate	pepton
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	8,66 <sup>c</sup> ±0,01	9,75 <sup>b</sup> ±0,02	8,50 <sup>d</sup> ±0,01	10,03 <sup>a</sup> ±0,01
2	<i>B.licheniformis</i> B85	8,55 <sup>c</sup> ±0,01	10,11 <sup>a</sup> ±0,03	8,68 <sup>b</sup> ±0,01	10,07 <sup>a</sup> ±0,01
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	8,20 <sup>b</sup> ±0,05	10,08 <sup>a</sup> ±0,02	8,03 <sup>b</sup> ±0,06	10,00 <sup>a</sup> ±0,04

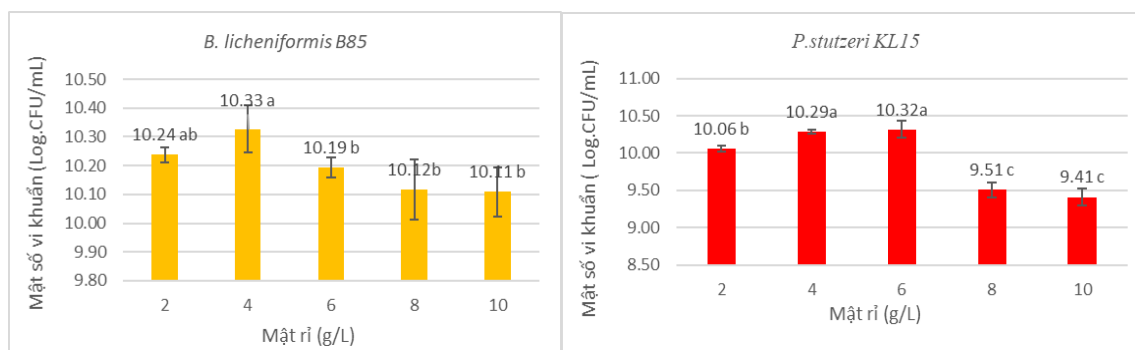
Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật thống kê theo nguồn nitơ dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.10** Ảnh hưởng nguồn cacbon đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

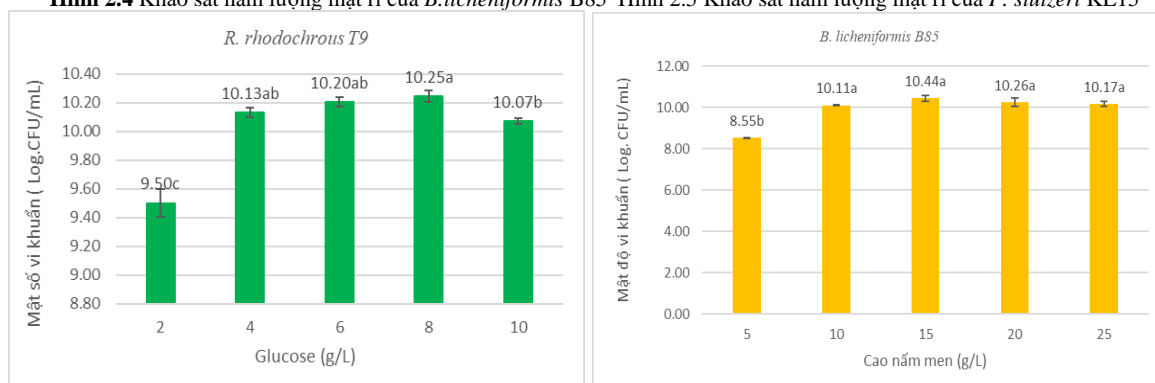
Stt	Dòng vi khuẩn		Mật độ vi khuẩn ( Log.CFU/mL)		
	Nguồn Cacbon	Glucose	Maltodextrin	Mật rỉ	Sucrose
1	<i>R.rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	10,07 <sup>a</sup> ±0,01	8,65 <sup>c</sup> ±0,01	9,75 <sup>b</sup> ±0,02	8,50 <sup>d</sup> ±0,01
2	<i>B.licheniformis</i> B85	10,10 <sup>a</sup> ±0,02	8,68 <sup>b</sup> ±0,01	10,11 <sup>a</sup> ±0,2	8,55 <sup>c</sup> ±0,01
3	<i>P.stutzeri</i> KL15	9,24 <sup>b</sup> ±0,05	9,28 <sup>b</sup> ±0,04	9,41 <sup>a</sup> ±0,06	8,75 <sup>c</sup> ±0,05

Mật độ vi khuẩn (Log<sub>10</sub>.CFU/mL) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật thống kê theo nguồn cacbon dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

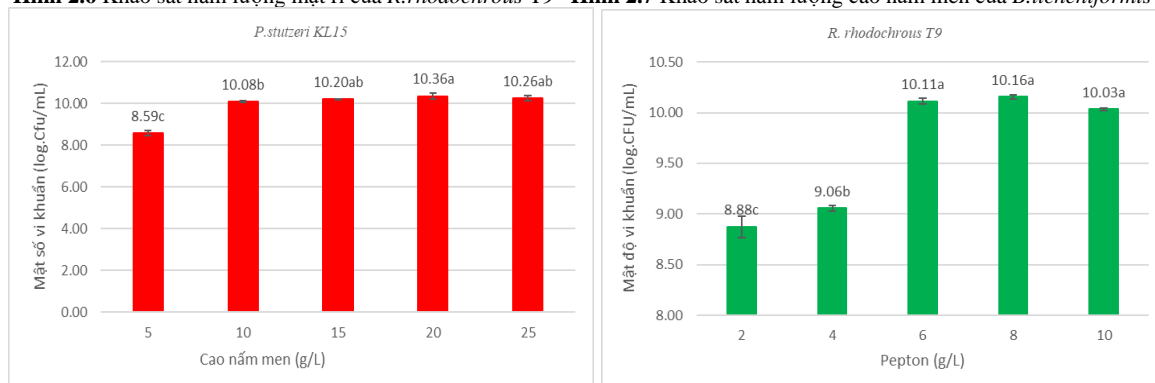
➤ **Khảo sát hàm lượng của nguồn cacbon và nitơ của ba chủng vi khuẩn.**



**Hình 2.4** Khảo sát hàm lượng mật rỉ của *B.licheniformis* B85 **Hình 2.5** Khảo sát hàm lượng mật rỉ của *P. stutzeri* KL15



**Hình 2.6** Khảo sát hàm lượng mật rỉ của *R.rhodochrous* T<sub>9</sub> **Hình 2.7** Khảo sát hàm lượng cao nấm men của *B.licheniformis* B85



**Hình 2.8** Khảo sát hàm lượng cao nấm men của *P. stutzeri* KL15 **Hình 2.9** Khảo sát hàm lượng pepton của *R.rhodochrous* T<sub>9</sub>

**Mục đích:** Khảo sát hàm lượng nguồn cacbon và nitơ là để khảo sát, lựa chọn các khoảng hàm

lượng của mật rỉ, cao nấm men cho mật độ vi khuẩn *B. licheniformis* B85, *P. Stutzeri* KL15 cao nhất, hàm lượng pepton và glucose cho mật độ vi khuẩn *R. rhodochrous* T9 cao nhất, để bố trí trong thí nghiệm tối ưu hóa thành phần môi trường sản xuất lỏng cho 3 chủng vi khuẩn. Đây là thí nghiệm trung gian sau khi lựa chọn nguồn C, N tốt nhất, để có sự lựa chọn tốt nhất, chuyển vào nội dung tối ưu hóa.

### 2.5.3 Tối ưu hóa môi trường sản xuất của các dòng vi khuẩn

#### ➤ Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng ma trận Plackett – Burman *Bacillus licheniformis* B85

**Bảng 2.11** Các biến trong ma trận Plackett - Burman và ảnh hưởng của chúng

Ký hiệu	Yếu tố	Đơn vị	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
			Thấp	Cao	Ảnh hưởng	Prob>F
			(-1)	(-1)		
X1	Mật rỉ đường	g/L	2	6	0,0433 <sup>a</sup>	0,0182
X2	Cao nấm men	g/L	9	25	-0,06 <sup>a</sup>	0,0050
X3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/L	1,25	5,00	-1,45862E-15 <sup>b</sup>	1,0000
X4	MgSO <sub>4</sub>	g/L	0,25	1,50	1,46724E-15 <sup>b</sup>	1,0000
X5	CaCl <sub>2</sub>	g/L	0,05	0,40	0,0033 <sup>b</sup>	0,8013
X6	NaCl	g/L	1	5	-0,0633 <sup>a</sup>	0,0040

*a*: có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$ ; *b*: không có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$

**Bảng 2.12** Ma trận thiết kế Plackett – Burman

thức	Các biến						Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/ml)	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	Thực nghiệm	Mô hình
1	1	-1	1	1	-1	1	10,12	10,10
2	1	1	-1	1	1	1	10,03	10,04
3	-1	1	1	-1	1	1	10,01	9,99
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10,13	10,12
5	-1	-1	1	-1	1	1	10,04	10,05
6	-1	-1	-1	1	-1	1	10,03	10,05
7	-1	1	-1	1	1	-1	10,07	10,06
8	1	1	1	-1	-1	-1	10,08	10,10
9	-1	-1	1	1	1	-1	10,16	10,16
10	1	1	-1	-1	-1	1	10,04	10,04
11	1	-1	-1	-1	1	-1	10,16	10,16
12	-1	1	1	1	-1	-1	10,05	10,06

**Bảng 2.13** Các hệ số trong phương trình hàm mục tiêu

Yếu tố	Hệ số ước tính	Bậc tự do	Sai số chuẩn	95% CI thấp	95% CI cao	VIF
Intercept	11,42	1	0,0093	11,40	11,44	
A-Mật rỉ đường	0,0386	1	0,0068	0,0211	0,0560	1,43
B-Cao nấm men	-0,0188	1	0,0057	-0,0334	-0,0041	1,0000

C-NaCl	-0,0439	1	0,0068	-0,0614	-0,0265	1,38
AB	0,0250	1	0,0080	0,0043	0,0457	1,0000
AC	0,0404	1	0,0109	0,0122	0,0685	1,73
BC	0,0425	1	0,0080	0,0218	0,0632	1,0000
A <sup>2</sup>	-0,0673	1	0,0092	-0,0908	-0,0438	1,21
B <sup>2</sup>	-0,1577	1	0,0092	-0,1812	-0,1342	1,21
C <sup>2</sup>	-0,0248	1	0,0092	-0,0483	-0,0013	1,21

➤ **Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng ma trận Plackett – Burman *Pseudomonas stutzeri* KL15**

**Bảng 2.14** Các biến trong ma trận Plackett - Burman và ảnh hưởng của chúng

Ký hiệu	Yếu tố	Đơn vị	Mức		Mức độ ảnh hưởng	Prob>F
			Thấp (-1)	Cao (1)	Ảnh hưởng	
X1	Mật rỉ đường	g/L	2	6	0,55 <sup>a</sup>	0,0002
X2	Cao nấm men	g/L	9	25	0,32 <sup>a</sup>	0,0029
X3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/L	1,25	5,00	0,03 <sup>b</sup>	0,6502
X4	MgSO <sub>4</sub>	g/L	0,25	1,50	0,25 <sup>a</sup>	0,0079
X5	CaCl <sub>2</sub>	g/L	0,05	0,40	0,09 <sup>b</sup>	0,1933
X6	NaCl	g/L	1	5	-0,15 <sup>b</sup>	0,0568

*a: có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$ ; <sup>b</sup>: không có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$*

**Bảng 2.15** Ma trận thiết kế Plackett - Burman

thức	Các biến						Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/ml)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	Thực nghiệm	Mô hình
1	1	1	-1	-1	-1	1	10,19	10,10
2	-1	1	-1	1	1	-1	10,01	10,04
3	1	-1	1	1	-1	1	10,05	10,06
4	1	1	-1	1	1	1	10,36	10,44
5	-1	1	1	-1	1	1	9,69	9,67
6	1	1	1	-1	-1	-1	10,16	10,27
7	-1	-1	1	-1	1	1	9,33	9,35
8	-1	1	1	1	-1	-1	10,08	9,98
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9,31	9,38
10	-1	-1	-1	1	-1	1	9,48	9,49
11	1	-1	-1	-1	1	-1	10,10	10,01
12	1	-1	1	1	1	-1	10,31	10,29

**Bảng 2.16** Các hệ số trong phương trình hàm mục tiêu

Yếu tố	Hệ số ước tính	Bậc tự do	Sai số chuẩn	95% CI thấp	95% CI cao	VIF
Intercept	11,55	1	0,0044	11,52	11,56	
A-Mật rỉ đường	0,155	1	0,0067	0,0150	0,0518	1,0000
B-Cao nấm men	0,043	1	0,0087	0,0011	0,019	1,0000
C-Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,058	1	0,0070	0,0027	0,089	1,0000

AB	0,0255	1	0,0038	0,0114	0,0546	1,0000
AC	0,0125	1	0,0038	0,0173	0,0023	1,0000
BC	0,01	1	0,0038	0,0148	0,0048	1,0000
A <sup>2</sup>	-0,1675	1	0,0040	-0,1748	-0,1544	1,01
B <sup>2</sup>	-0,095	1	0,0040	-0,1773	-0,1569	1,01
C <sup>2</sup>	-0,110	1	0,0040	-0,1898	-0,1694	1,01

➤ Sàng lọc các yếu tố có ý nghĩa bằng ma trận Plackett – Burman *Rhodococcus rhodochrous* T<sub>9</sub>

**Bảng 2.17** Các biến trong ma trận Plackett - Burman và ảnh hưởng của chúng

Ký hiệu	Yếu tố	Đơn vị	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
			Thấp	Cao	Ảnh hưởng	Prob>F
			(-1)	(-1)		
X1	Glucose	g/L	6	10	0,0683 <sup>a</sup>	0,042
X2	Pepton	g/L	4	8	0,0683 <sup>a</sup>	0,042
X3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/L	1,25	5,00	-0,0083 <sup>b</sup>	0,5713
X4	MgSO <sub>4</sub>	g/L	0,25	1,50	0,005 <sup>b</sup>	0,7313
X5	CaCl <sub>2</sub>	g/L	0,05	0,40	0,015 <sup>b</sup>	0,3255
X6	NaCl	g/L	1	5	-0,075 <sup>a</sup>	0,0028

<sup>a</sup>: có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$ ; <sup>b</sup>: không có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$

**Bảng 2.18** Ma trận thiết kế Plackett - Burman

thức	Các biến						Mật độ vi khuẩn (Log <sub>10</sub> . CFU/ml)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	Thực nghiệm	Mô hình
1	-1	-1	-1	1	-1	1	9,87	9,89
2	1	1	-1	-1	-1	1	10,03	10,03
3	1	1	1	-1	-1	-1	10,06	10,10
4	-1	-1	1	-1	1	1	9,87	9,89
5	1	1	-1	1	1	1	10,04	10,03
6	1	-1	1	1	1	-1	10,05	10,03
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9,98	9,96
8	1	-1	1	1	-1	1	9,96	9,96
9	-1	1	1	1	-1	-1	10,03	10,03
10	-1	1	-1	1	1	-1	10,04	10,03
11	-1	1	1	-1	1	1	9,98	9,96
12	1	-1	-1	-1	1	-1	10,04	10,03

**Bảng 2.19** Các hệ số trong phương trình hàm mục tiêu

Yếu tố	Hệ số ước tính	Bậc tự do	Sai số chuẩn	95% CI thấp	95% CI cao	VIF
Intercept	10,47	1	0,0044	10,46	10,48	
A-Glucose	-0,0088	1	0,0027	-0,0157	-0,0018	1,0000
B-Pepton	0,0150	1	0,0027	0,0081	0,0219	1,0000
C-NaCl	-0,0088	1	0,0027	-0,0157	-0,0018	1,0000
AB	-0,0500	1	0,0038	-0,0598	-0,0402	1,0000

AC	-0,0075	1	0,0038	-0,0173	0,0023	1,0000
BC	-0,0050	1	0,0038	-0,0148	0,0048	1,0000
A <sup>2</sup>	-0,1646	1	0,0040	-0,1748	-0,1544	1,01
B <sup>2</sup>	-0,1671	1	0,0040	-0,1773	-0,1569	1,01
C <sup>2</sup>	-0,1796	1	0,0040	-0,1898	-0,1694	1,01

## 2.6. Tạo sản phẩm dạng bột

### 2.6.1 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất trên môi trường bán rắn.

**Bảng 2.20** Ảnh hưởng của môi trường đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (Log <sub>10</sub> .CFU/mL)			
		Môi trường	Cám gạo	Cám bắp	Bã đậu nành
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	9,02 <sup>a</sup> ±0,01	8,88 <sup>b</sup> ±0,02	8,53 <sup>c</sup> ±0,02	8,93 <sup>ab</sup> ±0,02
2	<i>B. licheniformis</i> B85	8,91 <sup>b</sup> ±0,02	8,80 <sup>bc</sup> ±0,05	9,47 <sup>a</sup> ±0,05	8,58 <sup>c</sup> ±0,06
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	8,75 <sup>bc</sup> ±0,04	9,10 <sup>a</sup> ±0,04	8,85 <sup>ab</sup> ±0,02	8,53 <sup>c</sup> ±0,08

Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/gam) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật thống kê theo môi trường dòng dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.21** Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/g)			
		Tỷ lệ giống	2,5%	5%	7,5%
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	8,27 <sup>b</sup> ±0,1	9,02 <sup>a</sup> ±0,01	9,23 <sup>a</sup> ±0,04	9,26 <sup>a</sup> ±0,04
2	<i>B. licheniformis</i> B85	8,40 <sup>b</sup> ±0,04	9,47 <sup>a</sup> ±0,01	9,54 <sup>a</sup> ±0,05	9,50 <sup>a</sup> ±0,01
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	8,43 <sup>c</sup> ±0,01	9,10 <sup>b</sup> ±0,04	9,30 <sup>a</sup> ±0,03	9,34 <sup>a</sup> ±0,05

Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/gam) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật thống kê theo tỷ lệ giống của dòng dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.22** Ảnh hưởng độ ẩm đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/g)			
		Độ ẩm	45%	50%	55%
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	8,27 <sup>c</sup> ±0,07	9,03 <sup>a</sup> ±0,01	9,15 <sup>a</sup> ±0,04	8,57 <sup>b</sup> ±0,01
2	<i>B. licheniformis</i> B85	8,44 <sup>c</sup> ±0,06	9,47 <sup>a</sup> ±0,01	9,56 <sup>a</sup> ±0,05	8,74 <sup>b</sup> ±0,02
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	8,40 <sup>d</sup> ±0,01	9,14 <sup>b</sup> ±0,03	9,30 <sup>a</sup> ±0,03	8,84 <sup>c</sup> ±0,02

Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/gam) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật thống kê theo độ ẩm của dòng dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 2.23** Ảnh hưởng thời gian đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Stt	Dòng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/g)					
		Thời gian	36 giờ	48 giờ	60 giờ	72 giờ	84 giờ
1	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub>	8,27 <sup>d</sup>	9,23 <sup>b</sup>	9,30 <sup>b</sup>	9,79 <sup>a</sup>	9,24 <sup>b</sup>	8,94 <sup>c</sup>
		±0,1	±0,04	±0,05	±0,02	±0,02	±0,01
2	<i>B. licheniformis</i> B85	8,44 <sup>d</sup>	9,56 <sup>b</sup>	9,96 <sup>a</sup>	9,93 <sup>a</sup>	9,57 <sup>b</sup>	9,10 <sup>c</sup>
		±0,06	±0,01	±0,01	±0,02	±0,02	±0,01
3	<i>P. stutzeri</i> KL15	8,40 <sup>e</sup>	9,30 <sup>c</sup>	9,44 <sup>bc</sup>	9,70 <sup>a</sup>	9,50 <sup>b</sup>	9,12 <sup>d</sup>
		±0,01	±0,03	±0,06	±0,01	±0,02	±0,01

Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/gam) tính theo logarit cơ số 10 trung bình của 3 lần lặp lại. Chữ a, b, c chỉ sự khác biệt về mật thống kê theo thời gian của dòng dòng vi khuẩn ( $p < 0,01$ ).

### 2.6.2 Khảo sát các điều kiện bảo quản của các dòng vi khuẩn trên môi trường bán rắn

**Bảng 2.24** Ảnh hưởng thời gian đến sinh khối ba dòng vi khuẩn

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (ngày)	Mật độ vi khuẩn		
		<i>B. licheniformis</i> B85 (log.CFU/g)	<i>P. stutzeri</i> KL15 (log.CFU/g)	<i>R. rhodochrous</i> T <sub>9</sub> (log.CFU/g)
	0	9,72 ± 0,01	9,52 ± 0,05	9,26 ± 0,03
4 - 8	30	9,61 ± 0,03	9,36 ± 0,02	9,18 ± 0,01
	60	9,42 ± 0,02	9,26 ± 0,03	9,07 ± 0,02
	90	9,21 ± 0,03	9,11 ± 0,01	8,93 ± 0,03
	120	9,11 ± 0,02	8,94 ± 0,01	8,79 ± 0,05



	180	8,81 ± 0,03	8,25 ± 0,03	8,13 ± 0,04
	270	8,21 ± 0,02	7,72 ± 0,04	7,59 ± 0,05
	360	7,54 ± 0,04	6,46 ± 0,02	6,86 ± 0,03
	0	9,72 ± 0,01	9,52 ± 0,05	9,26 ± 0,03
28 - 32	30	9,38 ± 0,03	9,36 ± 0,02	9,11 ± 0,01
	60	9,20 ± 0,03	9,26 ± 0,03	9,01 ± 0,02
	90	9,11 ± 0,02	8,95 ± 0,03	8,86 ± 0,03
	120	8,92 ± 0,02	8,79 ± 0,04	8,70 ± 0,02
	180	8,32 ± 0,04	7,68 ± 0,03	7,50 ± 0,02
	270	7,84 ± 0,03	6,70 ± 0,01	6,89 ± 0,03
	360	6,87 ± 0,02	5,56 ± 0,03	5,83 ± 0,04

**2.7 Một số hình ảnh của lên men vi sinh vật dạng lỏng và bột.**



**Hình 2.10** Nguyên liệu từ trái qua phải : cám bắp, bã đậu nành, cám gạo và cám mì



**Hình 2.11** Hình ảnh lên men tăng sinh, sản xuất lỏng và bán rắn.

### PHỤ LỤC 3 (NỘI DUNG 3)

#### 3.1. Đánh giá sự chuyển hóa N của các dòng vi khuẩn trong nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở qui mô phòng thí nghiệm

##### Thông tin mẫu nước tôm thẻ chân trắng

**Địa chỉ thu mẫu:** khu nuôi tôm thẻ ở ấp Bình Phước, xã Bình Khánh, huyện Cần Giờ, TP. HCM.

##### Thông tin mẫu lúc lấy nước:

- + Tôm đạt 100 con/kg (khoảng 10g/con).
- + Lúc thả nuôi mật độ là 100 ngàn con.
- + Tôm ở giai đoạn sắp thương phẩm (1,5 tháng).
- + Ao sâu 1,2 m.
- + Mẫu lấy lúc 16h30, sau cho ăn, nước ao có màu xanh lá chuối (hơi xậm).

##### Thông tin quá trình lấy mẫu nước tôm thẻ chân trắng:

- + Trong suốt quá trình ít thay nước (lý do: nước sông Cần Giờ khá ô nhiễm).
- + Cho tôm ăn bằng thuốc (thức ăn) bổ tôm, ngày 3 buổi.
- + Gây màu nước bằng cách đánh vôi (dùng Donomite).
- + Khoảng 9h sáng bật quạt gió 1,5 tiếng. Buổi tối khoảng 18 – 22h tăng cường quạt gió liên tục, ngừng cho ăn.
- + Kinh nghiệm: nước ao tôm hơi mặn sẽ giúp tôm mau lớn.



**Hình 3.1** Thử nghiệm nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng trong PTN

**Bảng 3.1** Chỉ tiêu pH  
*pH ban đầu là  $7,8 \pm 0,2$*

NT	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
NT1	$7,6 \pm 0,21$	$7,6 \pm 0,24$	$7,5 \pm 0,19$	$7,5 \pm 0,26$	$7,4 \pm 0,2$
NT2	$7,7 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,21$	$7,4 \pm 0,15$	$7,4 \pm 0,23$	$7,4 \pm 0,2$
NT3	$7,7 \pm 0,15$	$7,5 \pm 0,17$	$7,4 \pm 0,23$	$7,3 \pm 0,21$	$7,3 \pm 0,11$
NT4	$7,6 \pm 0,19$	$7,5 \pm 0,23$	$7,3 \pm 0,27$	$7,5 \pm 0,18$	$7,3 \pm 0,28$
NT5	$7,6 \pm 0,15$	$7,6 \pm 0,22$	$7,5 \pm 0,13$	$7,4 \pm 0,17$	$7,4 \pm 0,27$
NTĐC	$7,7 \pm 0,16$	$7,6 \pm 0,26$	$7,6 \pm 0,12$	$7,5 \pm 0,24$	$7,5 \pm 0,21$

**Bảng 3.2** Hàm lượng ammonia (Ban đầu là 0,204 mg/L)

NT	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
NT1	0,22 <sup>ab</sup> ± 0,02	0,21 <sup>a</sup> ± 0,020	0,18 <sup>a</sup> ± 0,021	0,07 <sup>ab</sup> ± 0,019	0,06 <sup>ab</sup> ± 0,025
NT2	0,20 <sup>ab</sup> ± 0,023	0,19 <sup>ab</sup> ± 0,026	0,16 <sup>ab</sup> ± 0,031	0,07 <sup>ab</sup> ± 0,027	0,05 <sup>ab</sup> ± 0,026
NT3	0,20 <sup>ab</sup> ± 0,021	0,18 <sup>ab</sup> ± 0,040	0,15 <sup>ab</sup> ± 0,025	0,05 <sup>ab</sup> ± 0,035	0,04 <sup>ab</sup> ± 0,021
NT4	0,18 <sup>ab</sup> ± 0,05	0,16 <sup>ab</sup> ± 0,023	0,13 <sup>ab</sup> ± 0,021	0,05 <sup>ab</sup> ± 0,015	0,03 <sup>b</sup> ± 0,020
NT5	0,17 <sup>b</sup> ± 0,06	0,12 <sup>b</sup> ± 0,015	0,09 <sup>b</sup> ± 0,015	0,03 <sup>b</sup> ± 0,020	0,03 <sup>b</sup> ± 0,021
NTĐC	0,24 <sup>a</sup> ± 0,01	0,21 <sup>a</sup> ± 0,020	0,15 <sup>ab</sup> ± 0,019	0,12 <sup>a</sup> ± 0,017	0,10 <sup>a</sup> ± 0,025

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 3.3** Hàm lượng nitrite (Ban đầu là 0,108 mg/L)

NT	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6
NT1	0,11 <sup>b</sup> ± 0,020	0,12 <sup>bc</sup> ± 0,020	0,13 <sup>ab</sup> ± 0,021	0,1 <sup>b</sup> ± 0,019	0,06 <sup>b</sup> ± 0,025	0,04 <sup>b</sup> ± 0,025
NT2	0,11 <sup>b</sup> ± 0,021	0,12 <sup>c</sup> ± 0,026	0,13 <sup>b</sup> ± 0,031	0,1 <sup>b</sup> ± 0,027	0,07 <sup>b</sup> ± 0,026	0,04 <sup>bc</sup> ± 0,026
NT3	0,12 <sup>ab</sup> ± 0,021	0,12 <sup>bc</sup> ± 0,040	0,13 <sup>ab</sup> ± 0,025	0,1 <sup>b</sup> ± 0,035	0,05 <sup>c</sup> ± 0,021	0,03 <sup>cd</sup> ± 0,021
NT4	0,11 <sup>b</sup> ± 0,025	0,13 <sup>a</sup> ± 0,023	0,12 <sup>b</sup> ± 0,021	0,08 <sup>c</sup> ± 0,015	0,05 <sup>c</sup> ± 0,020	0,04 <sup>de</sup> ± 0,020
NT5	0,12 <sup>a</sup> ± 0,026	0,13 <sup>ab</sup> ± 0,015	0,14 <sup>a</sup> ± 0,015	0,08 <sup>c</sup> ± 0,020	0,05 <sup>c</sup> ± 0,021	0,02 <sup>e</sup> ± 0,021
NTĐC	0,11 <sup>b</sup> ± 0,020	0,12 <sup>c</sup> ± 0,020	0,13 <sup>b</sup> ± 0,019	0,12 <sup>a</sup> ± 0,017	0,12 <sup>a</sup> ± 0,025	0,1 <sup>a</sup> ± 0,025

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 3.4** Hàm lượng nitrate (Ban đầu là 0,204 mg/L)

NT	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6
NT1	0,27 <sup>b</sup> ± 0,032	0,31 <sup>cd</sup> ± 0,05	0,3 <sup>a</sup> ± 0,017	0,23 <sup>ab</sup> ± 0,01	0,20 <sup>a</sup> ± 0,03	0,1 <sup>b</sup> ± 0,02
NT2	0,33 <sup>a</sup> ± 0,06	0,30 <sup>d</sup> ± 0,02	0,22 <sup>b</sup> ± 0,07	0,22 <sup>b</sup> ± 0,02	0,20 <sup>a</sup> ± 0,05	0,1 <sup>b</sup> ± 0,04
NT3	0,28 <sup>b</sup> ± 0,02	0,32 <sup>c</sup> ± 0,01	0,31 <sup>a</sup> ± 0,02	0,23 <sup>a</sup> ± 0,03	0,18 <sup>ab</sup> ± 0,06	0,08 <sup>c</sup> ± 0,03
NT4	0,29 <sup>b</sup> ± 0,02	0,34 <sup>b</sup> ± 0,05	0,3 <sup>a</sup> ± 0,07	0,21 <sup>b</sup> ± 0,01	0,17 <sup>b</sup> ± 0,02	0,06 <sup>cd</sup> ± 0,02
NT5	0,29 <sup>b</sup> ± 0,06	0,36 <sup>a</sup> ± 0,07	0,3 <sup>a</sup> ± 0,05	0,21 <sup>b</sup> ± 0,02	0,16 <sup>b</sup> ± 0,04	0,05 <sup>d</sup> ± 0,02
NTĐC	0,21 <sup>c</sup> ± 0,01	0,20 <sup>e</sup> ± 0,01	0,19 <sup>c</sup> ± 0,01	0,19 <sup>c</sup> ± 0,02	0,18 <sup>ab</sup> ± 0,03	0,17 <sup>a</sup> ± 0,03

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 3.5** Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí (Ban đầu là  $2,7 \cdot 10^6$  CFU/ml tương ứng 6,43 log.CFU/mL)

NT	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
NT1	10,65	9,49	7,30	7,04	6,23
NT2	11,61	9,80	8,38	7,75	6,20
NT3	11,83	10,57	9,18	8,57	6,91
NT4	11,76	10,90	9,62	8,79	7,08
NT5	11,79	7,90	8,67	9,08	7,08
NTĐC	11,79	7,90	9,67	6,34	4,08

**Bảng 3.6** Mật độ vi khuẩn AOB (Ban đầu là  $4,7 \cdot 10^2$  CFU/ml tương ứng 2,67 log.CFU/mL)

NT	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
NT1	7,54	6,61	6,15	5,18	3,61
NT2	7,32	6,80	6,32	5,30	4,20
NT3	8,45	7,85	6,51	5,91	4,32
NT4	8,67	7,77	7,08	6,34	5,08
NT5	8,86	7,83	7,40	6,72	5,79
NTĐC	2,34	2,26	2,04	KPH	KPH

**Bảng 3.7** Mật độ vi khuẩn nitrite (Ban đầu là  $1,2 \cdot 10^2$  CFU/ml tương ứng  $2,08 \log_{10}$  CFU/mL)

NT	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
NT1	7,40	6,83	5,30	4,83	2,23
NT2	7,61	6,80	5,38	4,93	2,20
NT3	7,58	6,57	6,18	5,83	3,32
NT4	8,75	7,74	7,08	6,18	4,08
NT5	8,92	7,93	7,34	6,51	4,34
NTĐC	2,00	1,00	KPH	KPH	KPH

### 3.2. Đánh giá sự chuyển hóa N của các dòng vi khuẩn trong nước nuôi tôm thẻ chân trắng ở qui mô bể 1m<sup>3</sup>

**Bảng 3.8** Một số chỉ tiêu môi trường nước trong thí nghiệm

Thức	Các chỉ tiêu					
	Nhiệt độ (°C)		pH		DO (mg/L)	
	Buổi sáng	Buổi chiều	Buổi sáng	Buổi chiều	Buổi sáng	Buổi chiều
NTĐC	27,96 ± 0,94 <sup>a</sup>	29,37 ± 1,24 <sup>a</sup>	7,72 ± 0,33 <sup>a</sup>	7,76 ± 0,37 <sup>a</sup>	6,94 ± 0,56 <sup>a</sup>	6,68 ± 0,48 <sup>a</sup>
	(26,0 - 29,0)*	(26,6 - 31,3)*	(7,19 - 8,10)*	(7,12 - 8,36)*	(6,17 - 8,49)*	(6,11 - 8,06)
NT1	28,06 ± 0,96 <sup>a</sup>	29,26 ± 1,21 <sup>a</sup>	7,72 ± 0,22 <sup>a</sup>	7,65 ± 0,23 <sup>a</sup>	6,96 ± 0,56 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,54 <sup>a</sup>
	(26,0 - 29,6)*	(26,8 - 31,3)*	(7,24 - 8,01)*	(7,09 - 8,19)*	(6,01 - 8,45)*	(6,02 - 8,30)
NT2	28,06 ± 0,95 <sup>a</sup>	29,30 ± 1,18 <sup>a</sup>	7,78 ± 0,16 <sup>a</sup>	7,62 ± 0,24 <sup>a</sup>	6,97 ± 0,52 <sup>a</sup>	6,59 ± 0,48 <sup>a</sup>
	(26,1 - 29,5)*	(26,8 - 30,9)*	(7,23 - 8,04)*	(6,99 - 8,06)*	(6,29 - 8,43)*	(6,01 - 8,02)
NT3	28,05 ± 0,90 <sup>a</sup>	29,19 ± 1,15 <sup>a</sup>	7,74 ± 0,17 <sup>a</sup>	7,61 ± 0,24 <sup>a</sup>	6,86 ± 0,54 <sup>a</sup>	6,50 ± 0,48 <sup>a</sup>
	(26,2 - 29,6)*	(26,8 - 30,7)*	(7,10 - 8,04)*	(7,04 - 8,17)*	(5,45 - 8,35)*	(5,91 - 7,90)

Mean ± độ lệch chuẩn, \*: khoảng biến thiên, Trong cùng một hàng và cùng chỉ tiêu, các giá trị trung bình có kí tự giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 3.9** Một số chỉ tiêu môi trường nước khác trong thí nghiệm

Chỉ tiêu	Thức			
	NTĐC	NT1	NT2	NT3
Độ kiềm (mg/L)	106,75 ± 31,74 <sup>a</sup>	110,95 ± 21,99 <sup>a</sup>	121,25 ± 18,45 <sup>b</sup>	121,19 ± 15,83 <sup>b</sup>
	53,67 - 140,67*	82,67 - 144,00*	84,67 - 139,00*	82,67 - 144,00*
Độ mặn (‰)	20 ± 0,01 <sup>a</sup>	20 ± 0,01 <sup>a</sup>	20 ± 0,01 <sup>a</sup>	20 ± 0,01 <sup>a</sup>

Mean ± độ lệch chuẩn, \*: khoảng biến thiên, Trong cùng một hàng và cùng chỉ tiêu, các giá trị trung bình có kí tự giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 3.10** Mật độ vi khuẩn hiếu khí ( $\log_{10}$  CFU/mL)

Ngày thu mẫu	Mật độ vi khuẩn (Log.CFU/mL)				
	Lần	NTĐC	NT1	NT2	NT3
26-Nov	4,70	4,81	5,78	5,34	4,70
29-Nov	4,37	5,30	5,56	6,53	4,37
02-Dec	4,85	6,40	6,65	5,98	4,85
05-Dec	5,90	6,56	6,69	6,38	5,90
08-Dec	6,03	6,75	6,50	6,35	6,03
11-Dec	5,83	6,41	6,30	6,36	5,83

14-Dec	5,78	6,75	6,88	6,41	5,78
17-Dec	5,65	6,41	5,59	6,18	5,65
20-Dec	5,73	6,44	6,02	6,04	5,73
23-Dec	6,86	6,89	6,54	5,68	6,86
26-Dec	6,94	7,55	7,28	7,25	6,94
29-Dec	6,85	7,48	7,30	7,70	6,85

Ghi chú: Ngày thả tôm là ngày 23/11

**Bảng 3.11** Mật độ vi khuẩn *vibrio* (log<sub>10</sub>.CFU/mL)

Ngày thu mẫu	Mật độ vi khuẩn (log.CFU/mL)				
	Lần	NTĐC	NT1	NT2	NT3
26-Nov	1	3,18	3,32	2,28	2,23
29-Nov	2	3,40	3,18	2,48	2,54
02-Dec	3	4,94	4,11	3,14	3,11
05-Dec	4	5,17	4,33	3,28	3,19
08-Dec	5	5,10	4,10	3,11	3,14
11-Dec	6	5,27	4,27	3,26	3,22
14-Dec	7	5,30	4,27	3,29	3,30
17-Dec	8	6,34	4,29	3,29	3,25
20-Dec	9	6,39	4,26	3,25	3,20
23-Dec	10	6,70	4,29	4,24	4,28
26-Dec	11	6,81	5,28	4,28	4,31
29-Dec	12	6,85	5,30	4,34	4,26

Ghi chú: Ngày thả tôm là ngày 23/11

**Bảng 3.12** Mật độ vi khuẩn A0B (log<sub>10</sub>.CFU/mL)

Ngày thu mẫu	Mật độ vi khuẩn (log.CFU/mL)				
	Lần	NTĐC	NT1	NT2	NT3
26-Nov	1	KPH	KPH	KPH	KPH
29-Nov	2	KPH	3,87	3,94	3,97
02-Dec	3	3,32	3,46	3,61	3,56
05-Dec	4	3,72	3,79	3,67	4,78
08-Dec	5	3,61	4,79	4,75	4,88
11-Dec	6	3,94	4,87	4,86	5,99
14-Dec	7	3,88	4,92	4,82	6,01
17-Dec	8	4,69	5,75	5,97	5,90
20-Dec	9	4,45	5,56	5,74	5,77
23-Dec	10	4,62	5,65	6,81	6,75
26-Dec	11	4,84	5,86	6,90	6,96
29-Dec	12	4,83	5,95	6,04	6,18

Ghi chú: Ngày thả tôm là ngày 23/11

**Bảng 3.13.** Mật độ vi khuẩn NOB (log<sub>10</sub>.CFU/mL)

Ngày thu mẫu	Mật độ vi khuẩn (log.CFU/mL)				
	Lần	NTĐC	NT1	NT2	NT3

26-Nov	1	KPH	KPH	KPH	KPH
29-Nov	2	KPH	KPH	KPH	KPH
02-Dec	3	KPH	KPH	3,78	3,87
05-Dec	4	KPH	2,80	3,26	3,37
08-Dec	5	2,50	3,54	3,52	3,51
11-Dec	6	2,62	3,78	4,66	4,85
14-Dec	7	3,92	3,81	4,78	4,91
17-Dec	8	3,86	4,83	4,81	4,93
20-Dec	9	3,61	4,68	5,59	5,90
23-Dec	10	3,47	4,53	5,74	5,77
26-Dec	11	4,57	4,68	6,88	6,75
29-Dec	12	4,75	5,75	6,51	6,92

Ghi chú: Ngày thả tôm là ngày 23/11

**Bảng 3.14** Tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%)	WG (g/con)	SGR %/ngày
NTĐC	64,92 ± 23,41 <sup>c</sup>	0,44±0,06 <sup>b</sup>	15,22 ±0,5 <sup>c</sup>
NT1	89,97 ± 6,96 <sup>ab</sup>	0,52±0,06 <sup>b</sup>	14,70 ±0,64 <sup>bc</sup>
NT2	79,63 ± 11,20 <sup>b</sup>	0,68±0,04 <sup>a</sup>	16,61±0,48 <sup>a</sup>
NT3	93,87 ± 2,73 <sup>a</sup>	0,65±0,04 <sup>a</sup>	16,39±0,2 <sup>ab</sup>

### 3.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến môi trường nước nuôi tôm pH

Theo quy luật tự nhiên, pH buổi sáng thường thấp hơn buổi chiều. Sự dao động pH trong ngày cho phép nhỏ hơn 0,5 đơn vị, nếu lớn hơn 1 đơn vị/ngày phải can thiệp bằng hóa chất hoặc thay nước để giảm khoảng cách dao động. Ngoài ra, pH còn tác động gián tiếp đến đời sống của thủy sinh vật thông qua việc làm gia tăng độc tính của NH<sub>3</sub> trong trường hợp pH tăng cao và H<sub>2</sub>S tăng cao khi pH môi trường ao nuôi giảm. Theo Boyd (1990), khi pH giảm sẽ làm ngưng quá trình phân hủy vật chất hữu cơ làm cho các chất hữu cơ phân hủy không hoàn toàn. Điều này sinh ra nhiều độc tố trong môi trường ao nuôi.

#### Nhiệt độ

Trong ao nuôi nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến các quá trình sinh tổng hợp các chất hữu cơ cho sinh vật. Theo Whetstone và ctv, (2002) tôm có thể sống tốt ở nhiệt độ 23 – 24 °C, tối ưu là 26 – 29 °C và nhiệt độ trong ngày không dao động quá 5 °C (Boyd và ctv, 2003).

#### Oxy hòa tan (DO – Dissolved Oxygen)

Oxy hòa tan trong ao nuôi tôm là một trong những yếu tố quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của tôm. Hàm lượng oxy hòa tan thường thấp vào ban đêm (từ 1 – 6 giờ sáng) và cao nhất vào lúc 10 – 16 giờ nhờ sự quang hợp của phiêu sinh thực vật. Trong ao nuôi tôm hàm lượng oxy hòa tan > 4 mg/L là tốt nhất, khi lượng oxy hòa tan < 4 mg/L tôm vẫn ăn bình thường, nhưng hiệu quả thức ăn bắt đầu giảm và tăng các nhân tố gây bệnh. Nếu lượng oxy hòa tan tiếp tục xuống thấp hơn tôm sẽ ngừng ăn, bơi trên mặt nước và tập vào mé bờ ao (thành bể), nếu không xử lý kịp thời hiện tượng thiếu oxy sẽ dẫn đến tôm chết (khi hàm lượng oxy hòa tan < 1mg/L). Được cung cấp đủ oxy, tôm ăn khỏe hơn (Thái Bá Hồ và Ngô Trọng Lư, 2003). Tôm thẻ chân trắng thường lột xác đồng loạt vào ban đêm - thời điểm DO xuống thấp, khi lột xác mang tôm hấp thu oxy kém nên nhu cầu oxy cần nhiều hơn lúc bình thường. Nếu thiếu oxy xảy ra lúc lột xác, tôm sẽ chết đồng loạt ở đáy ao (bể) (vì quá trình lột xác xảy ra ở đáy ao/bể).

#### Độ kiềm

Độ kiềm tổng cộng chỉ khả năng trung hòa acid của nước. Độ kiềm tổng cộng cũng thể hiện tổng số các ion có tính bazơ trong nước như bicarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonat (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) và hydroxit (OH<sup>-</sup>). Bicarbonat là dạng chính của độ kiềm. Hàm lượng carbonat và hydroxit có thể cao khi phiêu sinh thực vật hoạt động mạnh hoặc trong một số loại nước nhất định hoặc trong nước thải.

Theo Charantchakool và ctv (2003), độ kiềm lý tưởng cho tăng trưởng và phát triển của tôm nuôi là từ 80 – 120 mgCaCO<sub>3</sub>/L, độ kiềm thấp hơn 40 mgCaCO<sub>3</sub>/L ảnh hưởng không tốt đến sức khỏe tôm nuôi. Khi độ kiềm thấp, pH sẽ biến động và gây stress, giảm tăng trưởng và thậm chí gây chết tôm.

### **Độ mặn**

Độ mặn ảnh hưởng trực tiếp đến việc điều hòa áp suất thẩm thấu của thủy sinh vật trong ao nuôi. Các thay đổi độ mặn vượt ra ngoài giới hạn thích ứng của tôm trong ao nuôi đều gây ra các phản ứng sốc của cơ thể làm giảm khả năng đề kháng bệnh của tôm. Theo Samocha (2019), tôm thẻ chân trắng có thể sống được ở độ mặn 20 – 35‰.

### **Ammonia tổng cộng (TAN - Total Ammonia Nitrogen)**

Với loài tôm, ammonia có thể chiếm tới 40 – 90% các chất bài tiết nitrogen (Vũ Thế Trụ, 1995). Ammonia rất độc đối với tôm, khi có nồng độ trong ao/bể khoảng 1 mg/L có khả năng gây hiện tượng tôm chết, khi nồng độ lớn hơn 0,1 mg/L sẽ ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của tôm. Do đó, cần duy trì nồng độ NH<sub>3</sub> nhỏ hơn 0,1 mg/L để an toàn cho tôm nuôi (Boyd, 1998).

NH<sub>3</sub> được cung cấp trong các thủy vực từ quá trình phân hủy bình thường các protein, xác bã động thực vật, sản phẩm bài tiết của động vật hay từ phân bón vô cơ và hữu cơ, trong đó nguồn NH<sub>3</sub> chủ yếu từ sự bài tiết trực tiếp của động vật thủy sinh (Chen và ctv, 1998)

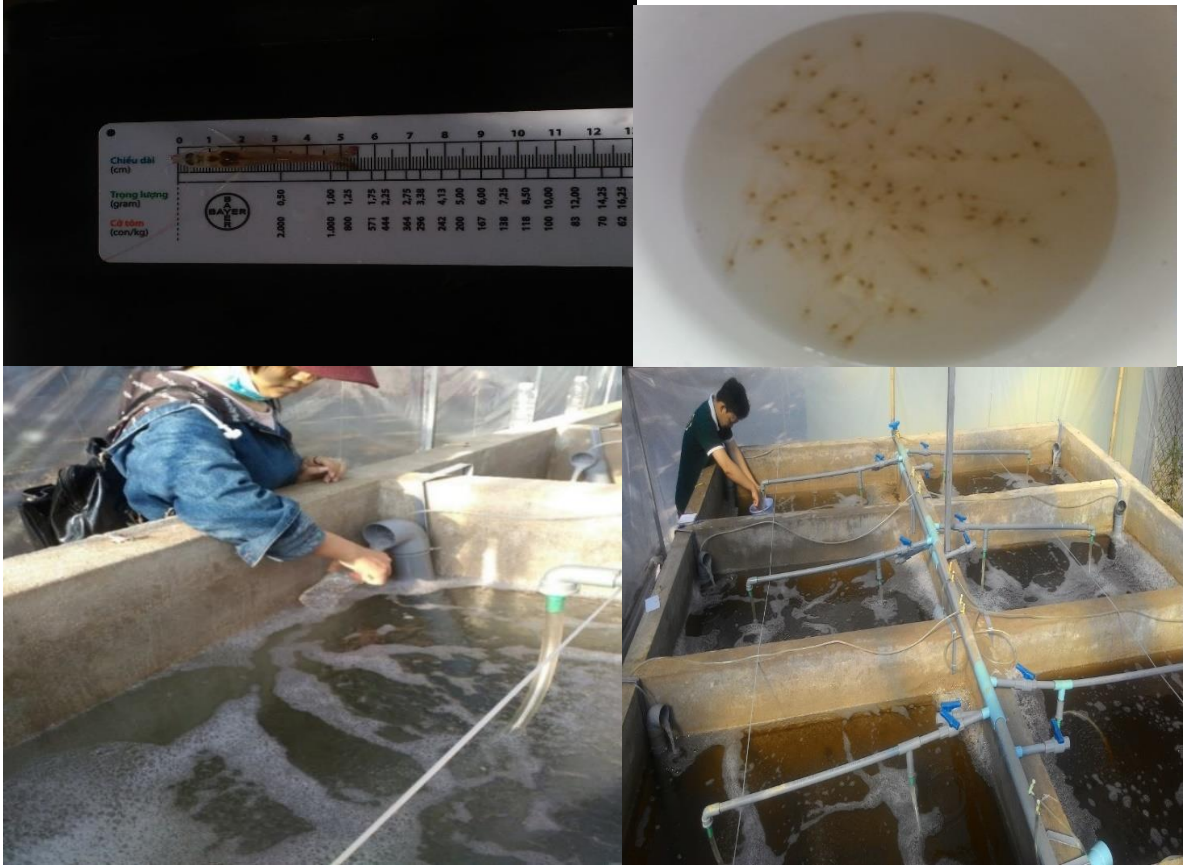
Khi pH tăng, sự chuyển đổi từ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sang NH<sub>3</sub> cũng tăng, gây độc cho tôm. NH<sub>3</sub> có độc tính cao hơn NH<sub>4</sub><sup>+</sup> vì NH<sub>3</sub> không mang điện tích dễ thấm qua tế bào mang cá, tôm, đồng thời có khả năng hòa tan chất béo (Phạm Văn Ty và Vũ Nguyên Thành, 2009). Khi hàm lượng NH<sub>3</sub> trong nước cao sẽ làm cho sinh vật khó bài tiết NH<sub>3</sub> từ máu và các mô ra môi trường nước. Vì vậy, nồng độ ammonia trong máu tăng dẫn đến tổn hại các cơ quan bên trong đặc biệt là gan và thận. Đặc tính gây độc của ammonia dựa vào tính chất kích thích của hợp chất này. Không giống như người và động vật, cá và giáp xác không có khả năng bài tiết cũng như chuyển hóa ammonia thành dạng ít độc. Sự hiện diện của NH<sub>3</sub> trong ao nuôi phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó đáng kể nhất là độ mặn, nhiệt độ và pH. Nếu NH<sub>3</sub> > 1,0 mg/L có thể gây chết tôm, NH<sub>3</sub> < 1,0 mg/L và > 0,1mg/L tôm tăng trưởng kém, NH<sub>3</sub> < 0,1 mg/L tôm phát triển tốt và khi tổng hàm lượng ammonia (TAN) > 2 mg/L sẽ gây chết tôm (Phạm Minh Nhựt, 2014).

### **Nitrite và Nitrate**

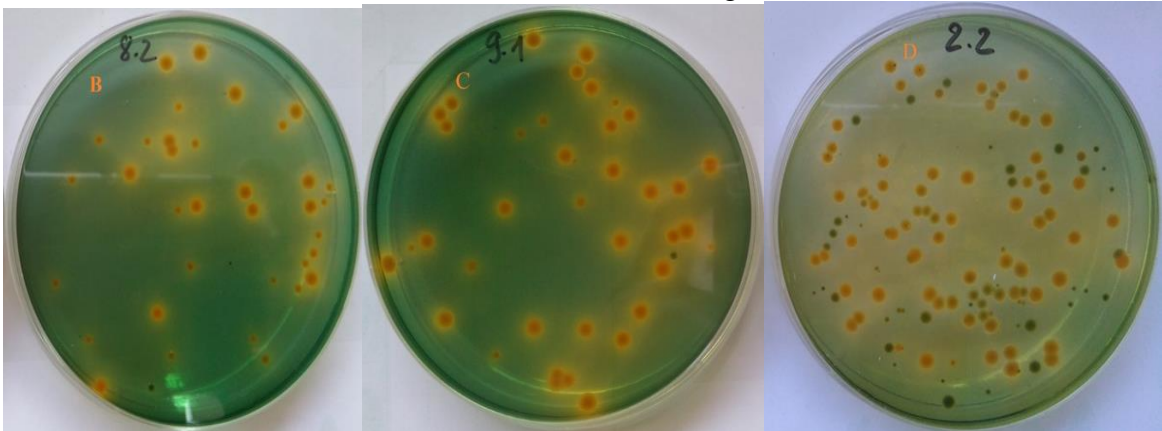
Độc tính của nitrite tác động đến hệ thống tuần hoàn và hệ thống miễn dịch của động vật. Nitrite xâm nhập vào máu và kìm hãm việc gắn oxy vào sắt của hemoglobin nên ngăn cản khả năng vận chuyển oxy. Tuy nhiên, đối với tôm cũng như các động vật không xương sống khác, không có chứa hemoglobin. Thay vào đó oxy gắn vào nhân đồng trên mang và sau đó vận chuyển oxy vào trong cơ thể. Ảnh hưởng về mặt sinh lý và mô học của nitrite trên động vật không xương sống vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng nhưng cũng có khả năng nitrite tác động lên nhân đồng trong hệ thống tuần hoàn của tôm. Nồng độ NO<sub>2</sub> gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự phát triển của tôm khi hàm lượng. Để xác định ảnh hưởng của độc tính NO<sub>3</sub> đối với tôm cần dựa vào tỷ lệ sống và tốc độ tăng trưởng của tôm. Do đó, người nuôi nên quan tâm đến việc giữ sức khỏe tôm thông qua việc đánh giá các đặc điểm khác như râu, mang và gan tụy. Đồng thời, người nuôi cần cẩn trọng khi nuôi tôm ở hàm lượng NO<sub>3</sub> trong nước trên 220 mg/l và giảm hàm lượng NO<sub>3</sub> khi nuôi tôm ở độ mặn thấp. Nitrate không độc trừ phi nó hiện diện trong nước với hàm lượng vượt quá 100 mg/L (Colt & Armstrong, 1979).

### **Vi khuẩn *Vibrio***

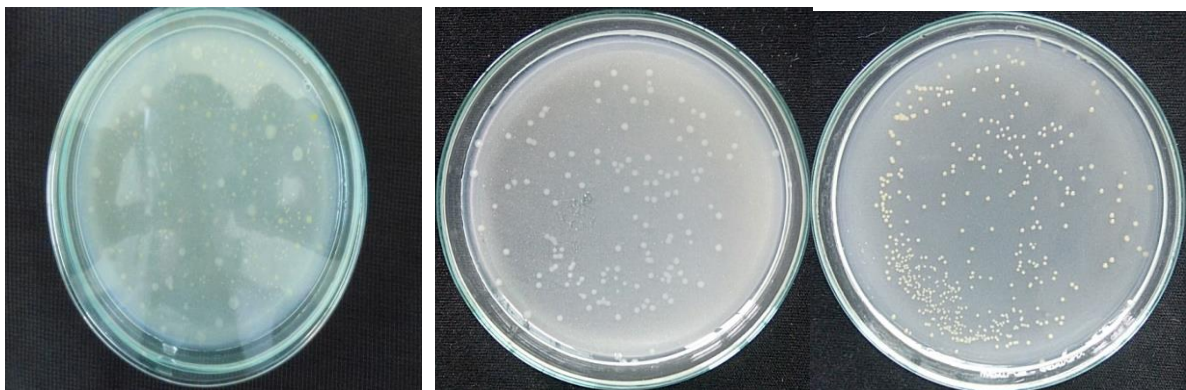
Bệnh Vibriosis là tên gọi chung cho các bệnh khác nhau ở động vật thủy sản do vi khuẩn *Vibrio* sp. gây ra. Một số chủng có khả năng tiết ra các men kitinase, lipase, proteaza gây nên hiện tượng ăn mòn hoại tử (Tem Dound, 1994). Đa số các bệnh nhiễm khuẩn xảy ra là do tác nhân gây bệnh *Vibrio* spp (*V. harveyi*, *V. splendid*, *V.alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*) và một số loài khác (Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh và ctv, 2010). Hầu hết các giống *Vibrio* spp đều phân bố trong môi trường nước mặn. Môi trường Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar (TCBS) là môi trường chọn lọc của *Vibrio* spp.



Hình 3.2 Một số hình ảnh thử nghiệm tôm



Vi khuẩn *Vibrio*



A. Tổng vi khuẩn hiếu khí

B. vi khuẩn AOB

C. vi khuẩn NOB

Hình 3.3 Mật số vi khuẩn *Vibrio* sp., mật số vi khuẩn AOB, NOB và tổng vi khuẩn hiếu khí



**Bảng 3.15** Hàm lượng TAN trong thời gian 30 ngày thử nghiệm tôm ở bể

Ngày	20-Nov	23-Nov	25-Nov	27-Nov	30-Nov	02-Dec	04-Dec	06-Dec	08-Dec	12-Dec	14-Dec	16-Dec	18-Dec	20-Dec	22-Dec	24-Dec	26-Dec	28-Dec	30-Dec
lần	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<b>ĐC</b>	1,18	2,42	2,15	1,58	1,92	1,11	1,12	2,32	3,84	5,53	7,29	7,45	8,89	7,93	6,96	6,28	4,60	4,46	4,17
<b>Ba lần lập</b>	1,16	2,43	2,16	1,58	1,79	1,17	1,35	2,73	3,44	5,24	9,18	7,87	8,67	5,11	7,21	6,29	4,56	4,32	4,32
	1,20	2,40	2,14	1,60	1,91	1,14	1,03	1,82	3,68	4,38	3,84	7,80	8,93	9,93	7,32	6,21	4,37	4,31	4,31
	1,17	2,44	2,15	1,56	2,06	1,01	0,98	2,41	4,39	6,98	8,85	6,67	9,08	8,75	6,34	6,34	4,87	4,76	3,89
<b>Sai số</b>	0,03	0,06	0,08	0,01	0,08	0,06	0,34	0,35	0,45	0,58	0,50	0,39	0,12	0,54	0,31	0,12	0,15	0,15	0,14
<b>NT1</b>	1,14	2,32	1,99	1,52	1,66	0,51	0,61	1,64	2,45	2,32	3,31	3,11	2,32	2,65	2,34	1,64	2,17	1,51	1,38
<b>Ba lần lập</b>	1,07	2,40	2,05	1,47	1,61	0,56	1,01	1,67	2,37	2,21	3,46	3,21	2,15	1,94	0,10	1,83	2,31	1,94	1,28
	1,15	2,27	1,91	1,58	1,76	0,45	0,47	1,68	2,45	1,77	3,24	2,87	2,67	2,32	0,43	1,56	2,29	1,04	1,73
	1,21	2,28	2,01	1,52	1,61	0,51	0,36	1,56	2,54	2,99	3,22	3,24	2,14	3,68	6,50	1,52	1,91	1,56	1,14
<b>Sai số</b>	0,06	0,07	0,09	0,03	0,05	0,20	0,29	0,24	0,05	0,36	0,08	0,12	0,18	0,53	0,54	0,10	0,13	0,26	0,18
<b>NT2</b>	1,12	2,28	1,86	1,37	1,18	0,47	0,44	1,02	2,60	2,45	2,90	1,84	1,77	2,12	1,03	2,13	2,21	1,42	1,21
<b>Ba lần lập</b>	1,09	2,28	1,85	1,39	1,19	0,43	0,39	1,11	3,08	1,34	4,67	1,45	3,54	1,81	1,16	2,01	0,16	0,51	1,46
	1,11	2,25	1,76	1,35	1,20	0,61	0,62	1,03	2,95	3,98	1,80	1,87	1,42	4,36	0,37	2,10	4,07	1,26	1,03
	1,15	2,31	1,98	1,36	1,15	0,37	0,31	0,92	1,78	2,03	2,24	2,21	0,35	0,18	1,56	2,29	2,39	2,50	1,14
<b>Sai số</b>	0,04	0,05	0,09	0,01	0,21	0,22	0,09	0,55	0,41	0,79	0,89	0,22	0,94	1,22	0,35	0,08	1,13	0,58	0,13
<b>NT3</b>	1,26	2,28	1,93	1,43	1,49	0,52	0,91	1,15	1,43	2,50	1,67	2,42	1,63	2,72	1,21	1,86	1,37	1,13	1,02
<b>Ba lần lập</b>	1,3	2,23	1,83	1,4	1,1	0,39	0,87	0,92	1,49	1,93	1,94	2,38	1,46	2,24	1,54	1,76	1,21	1,05	0,98
	1,27	2,25	1,9	1,39	1,73	0,46	0,85	1,1	1,11	3,2	0,23	2,45	1,79	2,95	1,12	1,91	1,76	1,1	1,04
	1,21	2,35	2,06	1,5	1,63	0,7	1,02	1,42	1,68	2,38	2,84	2,43	1,65	2,97	0,98	1,9	1,13	1,25	1,05
<b>Sai số</b>	0,36	0,06	0,07	0,09	0,34	0,33	0,34	0,57	0,48	0,37	0,77	0,02	0,10	0,24	0,17	0,05	0,20	0,06	0,02
		Ngày Bắt đầu																Ngày Kết thúc	

**Bảng 3.16** Hàm lượng Nitrite trong thời gian 30 ngày thử nghiệm tôm ở bể

Ngày	20-Nov	23-Nov	25-Nov	27-Nov	30-Nov	02-Dec	04-Dec	06-Dec	08-Dec	12-Dec	14-Dec	16-Dec	18-Dec	20-Dec	22-Dec	24-Dec	26-Dec	28-Dec	30-Dec
Lần	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<b>ĐC</b>	0,43	0,16	0,25	0,31	0,26	0,40	0,52	0,80	1,28	1,14	1,70	3,22	5,34	5,18	7,91	9,48	11,98	14,79	15,58
<b>L1</b>	0,40	0,16	0,25	0,28	0,21	0,32	0,54	0,91	1,94	1,10	1,26	3,12	5,21	4,94	7,84	9,32	10,12	13,29	14,52
<b>L2</b>	0,44	0,19	0,29	0,27	0,29	0,49	0,64	0,92	1,22	1,12	1,82	3,34	5,49	4,90	7,97	9,43	13,43	15,20	16,30
<b>L3</b>	0,46	0,12	0,21	0,37	0,27	0,38	0,38	0,56	0,68	1,21	2,02	3,20	5,32	5,71	7,91	9,69	12,39	15,89	15,93
<b>Sai số</b>	0,01	0,05	0,13	0,06	0,04	0,09	0,13	0,21	0,63	0,06	0,96	0,11	0,14	0,46	0,07	0,19	1,69	1,35	0,94
<b>NT1</b>	0,05	0,06	0,10	0,08	0,12	0,23	0,40	0,24	0,35	0,78	0,66	0,53	1,31	3,82	3,82	4,17	5,73	7,10	7,32
<b>L1</b>	0,03	0,08	0,09	0,06	0,13	0,19	0,42	0,22	0,35	0,75	0,72	0,46	1,31	3,78	3,65	3,97	5,48	6,78	7,32
<b>L2</b>	0,05	0,05	0,12	0,10	0,13	0,22	0,41	0,21	0,36	0,86	0,47	0,64	1,39	3,98	3,87	4,32	5,97	7,85	7,42
<b>L3</b>	0,07	0,06	0,09	0,09	0,09	0,29	0,38	0,28	0,33	0,73	0,78	0,49	1,22	3,69	3,95	4,21	5,75	6,67	7,21
<b>Sai số</b>	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,05	0,02	0,04	0,02	0,07	0,17	0,10	0,09	0,15	0,16	0,18	0,25	0,65	0,11
<b>NT2</b>	0,05	0,08	0,09	0,11	0,12	0,08	0,17	0,25	0,27	0,33	0,69	0,82	1,19	1,78	2,23	2,46	2,70	3,27	3,32
<b>L1</b>	0,04	0,06	0,09	0,09	0,08	0,09	0,12	0,28	0,37	0,35	0,87	0,97	1,73	1,89	2,97	2,23	2,37	3,24	3,21
<b>L2</b>	0,03	0,10	0,10	0,11	0,09	0,07	0,21	0,25	0,21	0,31	0,65	0,53	0,96	2,18	1,94	2,19	2,76	3,10	3,30
<b>L3</b>	0,08	0,08	0,08	0,12	0,18	0,08	0,17	0,22	0,23	0,33	0,54	0,96	0,87	1,27	1,79	2,97	2,98	3,47	3,45
<b>Sai số</b>	0,01	0,02	0,01	0,02	0,06	0,01	0,05	0,03	0,09	0,02	0,17	0,25	0,47	0,46	0,64	0,44	0,31	0,19	0,12
<b>NT3</b>	0,05	0,08	0,10	0,13	0,09	0,07	0,16	0,23	0,40	0,30	0,39	0,27	1,87	2,57	1,91	2,13	2,24	2,50	3,10
<b>L1</b>	0,04	0,10	0,12	0,19	0,09	0,08	0,15	0,24	0,42	0,30	0,54	0,28	1,93	2,29	1,87	2,21	2,19	2,94	3,21
<b>L2</b>	0,04	0,09	0,08	0,12	0,09	0,05	0,19	0,21	0,41	0,32	0,36	0,23	1,57	2,48	1,92	2,10	2,31	2,11	3,20
<b>L3</b>	0,06	0,06	0,10	0,07	0,08	0,07	0,14	0,25	0,38	0,28	0,28	0,30	2,10	2,94	1,93	2,09	2,21	2,46	2,90
<b>Sai số</b>	0,01	0,02	0,02	0,06	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,13	0,04	0,27	0,33	0,03	0,07	0,06	0,42	0,18
		Ngày Bắt đầu															Ngày Kết thúc		

**Bảng 3.17** Hàm lượng Nitrate trong thời gian 30 ngày thử nghiệm tằm ở bể

Ngày	20-Nov	23-Nov	25-Nov	27-Nov	30-Nov	02-Dec	04-Dec	06-Dec	08-Dec	12-Dec	14-Dec	16-Dec	18-Dec	20-Dec	22-Dec	24-Dec	26-Dec	28-Dec	30-Dec
Lần	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<b>NT ĐC</b>	0,44	2,92	2,54	2,45	2,25	3,79	4,26	4,10	4,75	5,49	6,91	8,76	10,92	14,46	22,31	33,63	41,60	52,07	61,11
<b>L1</b>	0,43	2,90	2,54	2,04	2,14	4,39	4,39	4,39	4,39	5,32	6,79	9,39	11,29	14,39	20,75	34,87	39,40	53,21	62,12
<b>L2</b>	0,44	2,89	2,27	2,42	2,41	2,99	4,21	3,92	4,89	5,69	6,92	7,39	10,38	13,98	23,98	32,10	42,10	50,23	60,19
<b>L3</b>	0,44	2,97	2,82	2,89	2,19	3,98	4,19	3,98	4,97	5,47	7,01	9,51	11,09	15,01	22,19	33,92	43,29	52,78	61,03
<b>Sai số</b>	0,01	0,04	0,28	0,43	0,14	0,72	0,11	0,26	0,31	0,19	0,11	1,19	1,23	1,12	1,62	1,41	1,99	1,61	0,01
<b>NT1</b>	0,53	2,52	2,61	3,12	2,82	3,14	3,41	3,63	4,19	4,76	6,45	7,10	5,31	8,32	9,35	10,77	13,63	15,22	18,51
<b>L1</b>	0,46	2,67	2,31	3,21	3,01	3,24	3,24	3,24	4,27	5,29	6,97	7,85	5,36	8,83	9,19	11,20	13,29	13,89	18,79
<b>L2</b>	0,59	2,53	2,56	2,93	2,69	2,98	3,47	3,87	4,28	4,98	6,38	7,43	5,03	7,43	9,39	11,01	13,49	15,98	19,01
<b>L3</b>	0,53	2,37	2,97	3,21	2,76	3,21	3,51	3,78	4,01	4,01	6,01	6,01	5,53	8,71	9,48	10,09	14,12	15,78	17,73
<b>Sai số</b>	0,12	0,15	0,33	0,16	0,17	0,35	0,15	0,34	0,15	0,67	0,48	0,96	0,25	0,78	0,15	0,59	0,43	1,15	0,12
<b>NT2</b>	0,56	2,24	2,81	3,03	2,75	2,59	3,14	3,05	4,11	4,10	3,47	5,97	8,03	7,82	6,79	8,73	9,18	11,15	13,86
<b>L1</b>	0,58	2,29	2,78	3,15	2,79	2,31	3,21	3,12	4,21	3,98	3,29	5,97	7,89	7,87	6,91	8,39	9,24	11,29	14,12
<b>L2</b>	0,54	2,23	2,81	2,93	2,69	2,56	3,01	3,01	4,12	4,12	3,34	6,14	8,12	7,79	6,98	8,94	9,18	11,02	13,49
<b>L3</b>	0,56	2,19	2,83	3,01	2,76	2,89	3,21	3,03	4,01	4,19	3,78	5,79	8,09	7,81	6,48	8,87	9,12	11,14	13,98
<b>Sai số</b>	0,02	0,05	0,03	0,11	0,05	0,29	0,12	0,19	0,10	0,11	0,27	0,18	0,13	0,18	0,27	0,30	0,29	0,35	0,02
<b>NT3</b>	0,50	1,94	2,02	2,28	2,32	2,91	3,11	2,91	2,84	3,27	3,37	4,06	4,47	5,36	5,83	8,20	7,24	8,87	10,03
<b>L1</b>	0,54	1,82	2,01	2,29	2,39	2,94	3,12	2,86	2,87	3,24	3,29	3,98	4,32	5,42	5,76	8,39	7,41	8,91	9,97
<b>L2</b>	0,52	2,01	1,92	2,23	2,31	2,91	3,19	2,97	2,76	3,29	3,34	4,09	4,56	5,29	5,84	8,12	7,19	9,12	10,01
<b>L3</b>	0,44	1,98	2,12	2,31	2,25	2,89	3,01	2,89	2,89	3,29	3,49	4,1	4,53	5,37	5,89	8,09	7,12	8,57	10,11
<b>Sai số</b>	0,05	0,10	0,10	0,04	0,07	0,30	0,09	0,23	1,20	0,40	0,50	0,23	0,13	0,16	0,14	0,17	0,15	0,28	0,05
		Ngày Bắt đầu															Ngày Kết thúc thu tằm		

Bảng 3.18 Tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm thử nghiệm tôm ở bể

Nghiem thức	Số tôm ban đầu	W0 (g)	W cuối (g)	W TB đầu (g/con)	Số tôm cuối	W TB cuối (g/con)	W thức ăn (g)	WG (g/con)	SGR (%/ngày)	Tỷ lệ sống
L1	2000	25,7	942,7	0,01	1960	0,48	295,24	0,47	15,09	98,000
L2	2000	27,27	668,69	0,01	1719	0,39	295,24	0,38	13,96	85,950
L3	2000	26,44	840,8	0,01	1719	0,49	289,12	0,48	15,05	85,950
NT1	2000	26,47	817,40	0,01	1799,33	0,45	293,20	0,44	14,70	89,967
Sai số		0,79	138,50	0,00	139,14	0,06	3,53	0,06	0,64	6,96
L1	2000	23,8	1065,94	0,01	1476	0,72	289,12	0,71	17,11	73,800
L2	2000	26,81	543,75	0,01	1451	0,65	289,85	0,63	16,15	72,550
L3	2000	25,7	1270,7	0,01	1851	0,69	294,91	0,67	16,58	92,550
NT2	<b>2000</b>	<b>25,44</b>	<b>960,13</b>	<b>0,01</b>	<b>1592,67</b>	<b>0,69</b>	<b>291,29</b>	<b>0,67</b>	<b>16,61</b>	<b>79,633</b>
Sai số		1,52	374,85	0,00	224,07	0,04	3,15	0,04	0,48	11,20
L1	2000	24,56	1270,5	0,01	1930	0,66	295,24	0,65	16,59	96,500
L2	2000	25,9	1185,1	0,01	1881	0,63	295,06	0,62	16,19	94,050
L3	2000	27,51	1032,12	0,01	1821	0,7	294,7	0,69	16,38	91,050
NT3	<b>2000</b>	<b>25,99</b>	<b>1162,57</b>	<b>0,01</b>	<b>1877,33</b>	<b>0,66</b>	<b>295,00</b>	<b>0,65</b>	<b>16,39</b>	<b>93,867</b>
Sai số		1,48	120,78	0,00	54,59	0,04	0,27	0,04	0,20	2,73
L1	2000	27,55	617,66	0,01	1337	0,46	283,17	0,45	14,64	66,850
L2	2000	27,29	457,42	0,01	812	0,56	288,37	0,55	15,5	40,600
L3	2000	27,4	989,83	0,01	1746	0,57	295,33	0,55	15,51	87,300
NT ĐC	<b>2000</b>	<b>27,41</b>	<b>688,30</b>	<b>0,01</b>	<b>1298,33</b>	<b>0,53</b>	<b>288,96</b>	<b>0,52</b>	<b>15,22</b>	<b>64,917</b>
Sai số		0,13	273,14	0,00	468,20	0,06	6,10	0,06	0,50	23,41

**Xử lý Anova - hàm lượng TAN của các nghiệm thức ương nuôi tôm giai đoạn post 5 trong bể.**

Function: ANOVA-1  
Data case no. 1 to 12

One way ANOVA grouped over variable 1 (NT)  
with values from 1 to 4.

**Variable 3 (1)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
-----				
Between	3	0.035	0.012	5.538
0.0236				
Within	8	0.017	0.002	
-----				
-----				
Total	11	0.052		

Coefficient of Variation = 3.90%

Var.	VARIABLE No. 3		SD	SE
1	Number	Sum	Average	
-----				
1	3.00	3.530	1.177	0.02
2	3.00	3.430	1.143	0.07
3	3.00	3.350	1.117	0.03
4	3.00	3.780	1.260	0.05
-----				
Total	12.00	14.090	1.174	0.07
Within			0.05	0.02

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 1.180 AB    Mean 4 = 1.260 A  
Mean 2 = 1.140 B    Mean 1 = 1.180 AB  
Mean 3 = 1.120 B    Mean 2 = 1.140 B  
Mean 4 = 1.260 A    Mean 3 = 1.120 B

**Variable 4 (2)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
-----				
Between	3	0.042	0.014	5.270
0.0268				
Within	8	0.021	0.003	
-----				
-----				
Total	11	0.064		

Coefficient of Variation = 2.23%

Var.	VARIABLE No. 4		SD	SE
1	Number	Sum	Average	
-----				
1	3.00	7.270	2.423	0.02
2	3.00	6.950	2.317	0.07
3	3.00	6.840	2.280	0.03

4	3.00	6.830	2.277	0.06	0.03
-----					
Total	12.00	27.890	2.324	0.08	0.02
Within			0.05		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 2.420 A    Mean 1 = 2.420 A  
Mean 2 = 2.320 AB    Mean 2 = 2.320 AB  
Mean 3 = 2.280 B    Mean 3 = 2.280 B  
Mean 4 = 2.280 B    Mean 4 = 2.280 B

**Variable 5 (3)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
-----				
Between	3	0.135	0.045	5.735
0.0216				
Within	8	0.063	0.008	
-----				
-----				
Total	11	0.198		

Coefficient of Variation = 4.47%

Var.	VARIABLE No. 5		SD	SE
1	Number	Sum	Average	
-----				
1	3.00	6.450	2.150	0.01
2	3.00	5.970	1.990	0.07
3	3.00	5.590	1.863	0.11
4	3.00	5.790	1.930	0.12
-----				
Total	12.00	23.800	1.983	0.13
Within			0.09	0.04

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 2.150 A    Mean 1 = 2.150 A  
Mean 2 = 1.990 AB    Mean 2 = 1.990 AB  
Mean 3 = 1.860 B    Mean 4 = 1.930 B  
Mean 4 = 1.930 B    Mean 3 = 1.860 B

**Variable 6 (4)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
-----				
Between	3	0.081	0.027	14.338
0.0014				
Within	8	0.015	0.002	
-----				
-----				
Total	11	0.097		

Coefficient of Variation = 2.95%

Var. VARIABLE No. 6

1	Number	Sum	Average	SD	SE	
1	3.00	4.740	1.580	0.02	0.03	
2	3.00	4.570	1.523	0.06	0.03	
3	3.00	4.100	1.367	0.02	0.03	
4	3.00	4.290	1.430	0.06	0.03	
Total		12.00	17.700	1.475	0.09	0.03
Within				0.04		
Original Order		Ranked Order				
Mean 1 =	1.580 A	Mean 1 =	1.580 A			
Mean 2 =	1.520 AB	Mean 2 =	1.520 AB			
Mean 3 =	1.370 C	Mean 4 =	1.430 BC			
Mean 4 =	1.430 BC	Mean 3 =	1.370 C			

**Variable 7 (5)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	0.868	0.289	8.201
0.0080				
Within	8	0.282	0.035	
----				
Total	11	1.150		

Coefficient of Variation = 12.03%

Var.	1	Number	Sum	Average	SD	SE
VARIABLE No. 7						
1	3.00	5.760	1.920	0.14	0.11	
2	3.00	4.980	1.660	0.09	0.11	
3	3.00	3.540	1.180	0.03	0.11	
4	3.00	4.460	1.487	0.34	0.11	
Total		12.00	18.740	1.562	0.32	0.09
Within				0.19		
Original Order		Ranked Order				
Mean 1 =	1.920 A	Mean 1 =	1.920 A			
Mean 2 =	1.660 AB	Mean 2 =	1.660 AB			
Mean 3 =	1.180 B	Mean 4 =	1.490 AB			
Mean 4 =	1.490 AB	Mean 3 =	1.180 B			

**Variable 8 (6)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	0.838	0.279	21.359
0.0004				
Within	8	0.105	0.013	
----				

Total 11 0.942

Coefficient of Variation = 17.59%

Var.	1	Number	Sum	Average	SD	SE
VARIABLE No. 8						
1	3.00	3.320	1.107	0.09	0.07	
2	3.00	1.520	0.507	0.06	0.07	
3	3.00	1.410	0.470	0.12	0.07	
4	3.00	1.550	0.517	0.16	0.07	
Total		12.00	7.800	0.650	0.29	0.08
Within				0.11		
Original Order		Ranked Order				
Mean 1 =	1.110 A	Mean 1 =	1.110 A			
Mean 2 =	0.5100 B	Mean 4 =	0.5200 B			
Mean 3 =	0.4700 B	Mean 2 =	0.5100 B			
Mean 4 =	0.5200 B	Mean 3 =	0.4700 B			

Mean 1 = 1.110 A Mean 1 = 1.110 A  
 Mean 2 = 0.5100 B Mean 4 = 0.5200 B  
 Mean 3 = 0.4700 B Mean 2 = 0.5100 B  
 Mean 4 = 0.5200 B Mean 3 = 0.4700 B

**Variable 9 (7)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	0.829	0.276	5.646
0.0225				
Within	8	0.392	0.049	
----				
Total	11	1.221		

Coefficient of Variation = 28.68%

Var.	1	Number	Sum	Average	SD	SE
VARIABLE No. 9						
1	3.00	3.360	1.120	0.20	0.13	
2	3.00	1.840	0.613	0.35	0.13	
3	3.00	1.320	0.440	0.16	0.13	
4	3.00	2.740	0.913	0.09	0.13	
Total		12.00	9.260	0.772	0.33	0.10
Within				0.22		
Original Order		Ranked Order				
Mean 1 =	1.120 A	Mean 1 =	1.120 A			
Mean 2 =	0.6100 BC	Mean 4 =	0.9100 AB			
Mean 3 =	0.4400 C	Mean 2 =	0.6100 BC			
Mean 4 =	0.9100 AB	Mean 3 =	0.4400 C			

Mean 1 = 1.120 A Mean 1 = 1.120 A  
 Mean 2 = 0.6100 BC Mean 4 = 0.9100 AB  
 Mean 3 = 0.4400 C Mean 2 = 0.6100 BC  
 Mean 4 = 0.9100 AB Mean 3 = 0.4400 C Variable 10 (8)

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				

Between	3	3.128	1.043	14.342
0.0014				
Within	8	0.582	0.073	
-----				
Total	11	3.709		

Coefficient of Variation = 17.61%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 10 Sum	Average	SD	SE
1	3.00	6.960	2.320	0.46	0.16
2	3.00	4.910	1.637	0.07	0.16
3	3.00	3.060	1.020	0.10	0.16
4	3.00	3.440	1.147	0.25	0.16
-----					
Total	12.00	18.370	1.531	0.58	0.17
Within			0.27		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 2.320 A    Mean 1 = 2.320 A  
 Mean 2 = 1.640 AB    Mean 2 = 1.640 AB  
 Mean 3 = 1.020 B    Mean 4 = 1.150 B  
 Mean 4 = 1.150 B    Mean 3 = 1.020 B

**Variable 11 (9)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	8.778	2.926	13.800
0.0016				
Within	8	1.696	0.212	
-----				
Total	11	10.474		

Coefficient of Variation = 17.85%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 11 Sum	Average	SD	SE
1	3.00	11.510	3.837	0.49	0.27
2	3.00	7.360	2.453	0.09	0.27
3	3.00	7.810	2.603	0.72	0.27
4	3.00	4.280	1.427	0.29	0.27
-----					
Total	12.00	30.960	2.580	0.98	0.28
Within			0.46		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 3.840 A    Mean 1 = 3.840 A  
 Mean 2 = 2.450 B    Mean 3 = 2.600 AB  
 Mean 3 = 2.600 AB    Mean 2 = 2.450 B  
 Mean 4 = 1.430 B    Mean 4 = 1.430 B

**Variable 12 (10)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-------	--------------------	----------------	-------------	---------

Between	3	21.782	7.261	6.563
0.0150				
Within	8	8.851	1.106	
-----				
Total	11	30.634		

Coefficient of Variation = 32.84%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 12 Sum	Average	SD	SE
1	3.00	16.600	5.533	1.32	0.61
2	3.00	6.970	2.323	0.62	0.61
3	3.00	7.350	2.450	1.37	0.61
4	3.00	7.510	2.503	0.64	0.61
-----					
Total	12.00	38.430	3.203	1.67	0.48
Within			1.05		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 5.530 A    Mean 1 = 5.530 A  
 Mean 2 = 2.320 B    Mean 4 = 2.500 B  
 Mean 3 = 2.450 B    Mean 3 = 2.450 B  
 Mean 4 = 2.500 B    Mean 2 = 2.320 B

**Variable 13 (11)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	53.292	17.764	5.416
0.0250				
Within	8	26.238	3.280	
-----				
Total	11	79.530		

Coefficient of Variation = 47.75%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 13 Sum	Average	SD	SE
1	3.00	21.870	7.290	2.99	1.05
2	3.00	9.920	3.307	0.13	1.05
3	3.00	8.710	2.903	1.55	1.05
4	3.00	5.010	1.670	1.33	1.05
-----					
Total	12.00	45.510	3.793	2.69	0.78
Within			1.81		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 5.530 A    Mean 1 = 5.530 A  
 Mean 2 = 2.320 B    Mean 4 = 2.500 B  
 Mean 3 = 2.450 B    Mean 3 = 2.450 B  
 Mean 4 = 2.500 B    Mean 2 = 2.320 B

**Variable 14 (12)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	58.425	19.475	121.321
0.0000				
Within	8	1.284	0.161	
----				
Total	11	59.709		

Coefficient of Variation = 10.82%

Var. 1	VARIABLE Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	22.340	7.447	0.67	0.23
2	3.00	9.320	3.107	0.21	0.23
3	3.00	5.530	1.843	0.38	0.23
4	3.00	7.260	2.420	0.04	0.23
Total	12.00	44.450	3.704	2.33	0.67
Within			0.40		

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 7.450 A	Mean 1 = 7.450 A
Mean 2 = 3.110 B	Mean 2 = 3.110 B
Mean 3 = 1.840 C	Mean 4 = 2.420 BC
Mean 4 = 2.420 BC	Mean 3 = 1.840 C

**Variable 15 (13)**

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	110.588	36.863	52.694
0.0000				
Within	8	5.597	0.700	
----				
Total	11	116.185		

Coefficient of Variation = 22.89%

Var. 1	VARIABLE Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	26.680	8.893	0.21	0.48
2	3.00	6.960	2.320	0.30	0.48
3	3.00	5.310	1.770	1.62	0.48
4	3.00	4.900	1.633	0.17	0.48
Total	12.00	43.850	3.654	3.25	0.94
Within			0.84		

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 8.890 A	Mean 1 = 8.890 A
Mean 2 = 2.320 B	Mean 2 = 2.320 B
Mean 3 = 1.770 B	Mean 3 = 1.770 B
Mean 4 = 1.630 B	Mean 4 = 1.630 B

**Variable 16 (14)**

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	67.195	22.398	7.623
0.0099				
Within	8	23.507	2.938	
----				
Total	11	90.703		

Coefficient of Variation = 44.51%

Var. 1	VARIABLE Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	23.790	7.930	2.51	0.99
2	3.00	7.940	2.647	0.91	0.99
3	3.00	6.350	2.117	2.11	0.99
4	3.00	8.130	2.710	0.41	0.99
Total	12.00	46.210	3.851	2.87	0.83
Within			1.71		

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 7.930 A	Mean 1 = 7.930 A
Mean 2 = 2.650 B	Mean 4 = 2.710 B
Mean 3 = 2.120 B	Mean 2 = 2.650 B
Mean 4 = 2.710 B	Mean 3 = 2.120 B

**Variable 17 (15)**

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	69.322	23.107	6.734
0.0140				
Within	8	27.451	3.431	
----				
Total	11	96.773		

Coefficient of Variation = 64.19%

Var. 1	VARIABLE Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	20.870	6.957	0.54	1.07
2	3.00	7.030	2.343	3.60	1.07
3	3.00	3.090	1.030	0.61	1.07
4	3.00	3.640	1.213	0.29	1.07
Total	12.00	34.630	2.886	2.97	0.86
Within			1.85		

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 6.960 A	Mean 1 = 6.960 A
Mean 2 = 2.340 B	Mean 2 = 2.340 B
Mean 3 = 1.030 B	Mean 4 = 1.210 B
Mean 4 = 1.210 B	Mean 3 = 1.030 B



**Variable 18 (16)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	44.020	14.673	974.965
0.0000				
Within	8	0.120	0.015	
-----				
Total	11	44.140		

Coefficient of Variation = 4.12%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 18 Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	18.840	6.280	0.07	0.07
2	3.00	4.910	1.637	0.17	0.07
3	3.00	6.400	2.133	0.14	0.07
4	3.00	5.570	1.857	0.08	0.07
-----					
Total	12.00	35.720	2.977	2.00	0.58
Within			0.12		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 6.280 A    Mean 1 = 6.280 A  
 Mean 2 = 1.640 C    Mean 3 = 2.130 B  
 Mean 3 = 2.130 B    Mean 4 = 1.860 BC  
 Mean 4 = 1.860 BC    Mean 2 = 1.640 C

**Variable 19 (17)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	17.580	5.860	5.746
0.0215				
Within	8	8.159	1.020	
-----				
Total	11	25.738		

Coefficient of Variation = 39.05%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 19 Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	13.800	4.600	0.25	0.58
2	3.00	6.510	2.170	0.23	0.58
3	3.00	6.620	2.207	1.96	0.58
4	3.00	4.100	1.367	0.34	0.58
-----					
Total	12.00	31.030	2.586	1.53	0.44
Within			1.01		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 4.600 A    Mean 1 = 4.600 A  
 Mean 2 = 2.170 B    Mean 3 = 2.210 B

Mean 3 = 2.210 B    Mean 2 = 2.170 B  
 Mean 4 = 1.370 B    Mean 4 = 1.370 B

**Variable 20 (18)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	21.952	7.317	22.671
0.0003				
Within	8	2.582	0.323	
-----				
Total	11	24.534		

Coefficient of Variation = 26.63%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 20 Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	13.390	4.463	0.26	0.33
2	3.00	4.540	1.513	0.45	0.33
3	3.00	4.270	1.423	1.01	0.33
4	3.00	3.400	1.133	0.10	0.33
-----					
Total	12.00	25.600	2.133	1.49	0.43
Within			0.57		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 4.460 A    Mean 1 = 4.460 A  
 Mean 2 = 1.510 B    Mean 2 = 1.510 B  
 Mean 3 = 1.420 B    Mean 3 = 1.420 B  
 Mean 4 = 1.130 B    Mean 4 = 1.130 B

**Variable 21 (19)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	20.012	6.671	129.150
0.0000				
Within	8	0.413	0.052	
-----				
Total	11	20.425		

Coefficient of Variation = 11.67%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 21 Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	12.520	4.173	0.25	0.13
2	3.00	4.150	1.383	0.31	0.13
3	3.00	3.630	1.210	0.22	0.13
4	3.00	3.070	1.023	0.04	0.13
-----					
Total	12.00	23.370	1.948	1.36	0.39
Within			0.23		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 4.170 A Mean 1 = 4.170 A  
 Mean 2 = 1.380 B Mean 2 = 1.380 B

Mean 3 = 1.210 B Mean 3 = 1.210 B  
 Mean 4 = 1.020 B Mean 4 = 1.020 B

**Xử lý Anova - hàm lượng NO<sub>2</sub> của của các nghiệm thức ương nuôi tôm giai đoạn post 5 trong bể.**

Function: ANOVA-1

Data case no. 1 to 12

One way ANOVA grouped over variable 1 (NT)  
 with values from 1 to 4.

**Variable 3 (1)**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	0.333	0.111	204.656
Within	8	0.004	0.001	
Total	11	0.337		

Coefficient of Variation = 16.05%

Var. 1	VARIABLE No. 3	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	1.300	0.433	0.03	0.01	
2	3.00	0.150	0.050	0.02	0.01	
3	3.00	0.150	0.050	0.03	0.01	
4	3.00	0.140	0.047	0.01	0.01	

Total	12.00	1.740	0.145	0.18	0.05
Within			0.02		

Original Order                  Ranked Order

Mean 1 = 0.4300 A Mean 1 = 0.4300 A  
 Mean 2 = 0.05000 B Mean 2 = 0.05000 B  
 Mean 3 = 0.05000 B Mean 3 = 0.05000 B  
 Mean 4 = 0.05000 B Mean 4 = 0.05000 B

**Variable 4 (2)**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	0.015	0.005	8.981
Within	8	0.005	0.001	
Total	11	0.020		

Coefficient of Variation = 25.02%

Var. 1	VARIABLE No. 4	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	0.470	0.157	0.04	0.01	
2	3.00	0.190	0.063	0.02	0.01	

3	3.00	0.240	0.080	0.02	0.01
4	3.00	0.250	0.083	0.02	0.01
Total	12.00	1.150	0.096	0.04	0.01
Within			0.02		

Mean 1 = 0.1600 A Mean 1 = 0.1600 A  
 Mean 2 = 0.06000 B Mean 4 = 0.08000 AB  
 Mean 3 = 0.08000 AB Mean 3 = 0.08000 AB  
 Mean 4 = 0.08000 AB Mean 2 = 0.06000 B

**Variable 5 (3)**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	0.053	0.018	29.500
Within	8	0.005	0.001	
Total	11	0.058		

Coefficient of Variation = 18.14%

Var. 1	VARIABLE No. 5	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	0.750	0.250	0.04	0.01	
2	3.00	0.300	0.100	0.02	0.01	
3	3.00	0.270	0.090	0.01	0.01	
4	3.00	0.300	0.100	0.02	0.01	

Total	12.00	1.620	0.135	0.07	0.02
Within			0.02		

Original Order                  Ranked Order

Mean 1 = 0.2500 A Mean 1 = 0.2500 A  
 Mean 2 = 0.1000 B Mean 2 = 0.1000 B  
 Mean 3 = 0.09000 B Mean 4 = 0.1000 B  
 Mean 4 = 0.1000 B Mean 3 = 0.09000 B

**Variable 6 (4)**

**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	0.094	0.031	17.059
Within	8	0.015	0.002	
Total	11	0.108		

Coefficient of Variation = 27.48%

Var. 1	VARIABLE Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	0.920	0.307	0.06	0.02
2	3.00	0.250	0.083	0.02	0.02
3	3.00	0.320	0.107	0.02	0.02
4	3.00	0.380	0.127	0.06	0.02
Total		12.00	1.870	0.156	0.10
Within				0.10	0.03
Original Order				0.04	
Ranked Order					

Mean 1 = 0.3100 A Mean 1 = 0.3100 A  
 Mean 2 = 0.08000 B Mean 4 = 0.1300 B  
 Mean 3 = 0.1100 B Mean 3 = 0.1100 B  
 Mean 4 = 0.1300 B Mean 2 = 0.08000 B

**Variable 7 (5)**  
 ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	0.052	0.017	13.106
0.0019				
Within	8	0.011	0.001	
----				
Total	11	0.063		

Coefficient of Variation = 25.33%

Var. 1	VARIABLE Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	0.770	0.257	0.04	0.02
2	3.00	0.350	0.117	0.02	0.02
3	3.00	0.350	0.117	0.06	0.02
4	3.00	0.260	0.087	0.01	0.02
Total		12.00	1.730	0.144	0.08
Within				0.08	0.02
Original Order				0.04	
Ranked Order					

Mean 1 = 0.2600 A Mean 1 = 0.2600 A  
 Mean 2 = 0.1200 B Mean 2 = 0.1200 B  
 Mean 3 = 0.1200 B Mean 3 = 0.1200 B  
 Mean 4 = 0.09000 B Mean 4 = 0.09000 B

**Variable 8 (6)**  
 ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	0.215	0.072	27.627
0.0001				
Within	8	0.021	0.003	
----				
Total	11	0.236		

Coefficient of Variation = 26.26%

Var. 1	VARIABLE Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	1.190	0.397	0.09	0.03
2	3.00	0.700	0.233	0.05	0.03
3	3.00	0.240	0.080	0.01	0.03
4	3.00	0.200	0.067	0.02	0.03
Total		12.00	2.330	0.194	0.15
Within				0.15	0.04
Original Order					
Ranked Order					

Mean 1 = 0.4000 A Mean 1 = 0.4000 A  
 Mean 2 = 0.2300 B Mean 2 = 0.2300 B  
 Mean 3 = 0.08000 BC Mean 3 = 0.08000 BC  
 Mean 4 = 0.07000 C Mean 4 = 0.07000 C

**Variable 9 (7)**  
 ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	0.287	0.096	18.821
0.0006				
Within	8	0.041	0.005	
----				
Total	11	0.328		

Coefficient of Variation = 22.83%

Var. 1	VARIABLE Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	1.560	0.520	0.13	0.04
2	3.00	1.210	0.403	0.02	0.04
3	3.00	0.500	0.167	0.05	0.04
4	3.00	0.480	0.160	0.03	0.04
Total		12.00	3.750	0.312	0.17
Within				0.17	0.05
Original Order					
Ranked Order					

Mean 1 = 0.5200 A Mean 1 = 0.5200 A  
 Mean 2 = 0.4000 A Mean 2 = 0.4000 A  
 Mean 3 = 0.1700 B Mean 3 = 0.1700 B  
 Mean 4 = 0.1600 B Mean 4 = 0.1600 B

**Variable 10 (8)**  
 ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
----				
Between	3	0.698	0.233	20.765
0.0004				
Within	8	0.090	0.011	
----				
Total	11	0.787		

Coefficient of Variation = 27.91%

Var.	VARIABLE No. 10				
1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	2.390	0.797	0.21	0.06
2	3.00	0.710	0.237	0.04	0.06
3	3.00	0.750	0.250	0.03	0.06
4	3.00	0.700	0.233	0.02	0.06
-----					
Total	12.00	4.550	0.379	0.27	0.08
Within			0.11		
-----					
Original Order		Ranked Order			
Mean 1 =	0.8000 A	Mean 1 =	0.8000 A		
Mean 2 =	0.2400 B	Mean 3 =	0.2500 B		
Mean 3 =	0.2500 B	Mean 2 =	0.2400 B		
Mean 4 =	0.2300 B	Mean 4 =	0.2300 B		

**Variable 11 (9)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
-----					
Between	3	2.015	0.672	6.587	0.0149
Within	8	0.816	0.102		
-----					
Total	11	2.831			

Coefficient of Variation = 55.53%

Var.	VARIABLE No. 11				
1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	3.840	1.280	0.63	0.18
2	3.00	1.040	0.347	0.02	0.18
3	3.00	0.810	0.270	0.09	0.18
4	3.00	1.210	0.403	0.02	0.18
-----					
Total	12.00	6.900	0.575	0.51	0.15
Within			0.32		
-----					
Original Order		Ranked Order			
Mean 1 =	1.280 A	Mean 1 =	1.280 A		
Mean 2 =	0.3500 B	Mean 4 =	0.4000 B		
Mean 3 =	0.2700 B	Mean 2 =	0.3500 B		
Mean 4 =	0.4000 B	Mean 3 =	0.2700 B		

**Variable 12 (10)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
-----					
Between	3	1.454	0.485	212.248	0.0000
Within	8	0.018	0.002		
-----					
Total	11	1.472			

Coefficient of Variation = 7.49%

Var.	VARIABLE No. 12				
1	Number	Sum	Average	SD	SE
-----					

1	3.00	3.430	1.143	0.06	0.03
2	3.00	2.340	0.780	0.07	0.03
3	3.00	0.990	0.330	0.02	0.03
4	3.00	0.900	0.300	0.02	0.03
-----					
Total	12.00	7.660	0.638	0.37	0.11
Within			0.05		

Original Order		Ranked Order			
Mean 1 =	1.140 A	Mean 1 =	1.140 A		
Mean 2 =	0.7800 B	Mean 2 =	0.7800 B		
Mean 3 =	0.3300 C	Mean 3 =	0.3300 C		
Mean 4 =	0.3000 C	Mean 4 =	0.3000 C		

**Variable 13 (11)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
-----					
Between	3	2.984	0.995	17.437	0.0007
Within	8	0.456	0.057		
-----					
Total	11	3.441			

Coefficient of Variation = 27.80%

Var.	VARIABLE No. 13				
1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	5.100	1.700	0.39	0.14
2	3.00	1.970	0.657	0.16	0.14
3	3.00	2.060	0.687	0.17	0.14
4	3.00	1.180	0.393	0.13	0.14
-----					
Total	12.00	10.310	0.859	0.56	0.16
Within			0.24		

Original Order		Ranked Order			
Mean 1 =	1.700 A	Mean 1 =	1.700 A		
Mean 2 =	0.6600 B	Mean 3 =	0.6900 B		
Mean 3 =	0.6900 B	Mean 2 =	0.6600 B		
Mean 4 =	0.3900 B	Mean 4 =	0.3900 B		

**Variable 14 (12)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
-----					
Between	3	16.615	5.538	257.291	0.0000
Within	8	0.172	0.022		
-----					
Total	11	16.787			

Coefficient of Variation = 12.13%

Var.	VARIABLE No. 14				
1	Number	Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	9.660	3.220	0.11	0.08
2	3.00	1.590	0.530	0.10	0.08

3	3.00	2.460	0.820	0.25	0.08
4	3.00	0.810	0.270	0.04	0.08
-----					
Total	12.00	14.520	1.210	1.24	0.36
Within			0.15		
Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	3.200	A	Mean 1 =	3.200	A
Mean 2 =	0.5300	BC	Mean 3 =	0.8200	B
Mean 3 =	0.8200	B	Mean 2 =	0.5300	BC
Mean 4 =	0.2700	C	Mean 4 =	0.2700	C

**Variable 15 (13)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	34.779	11.593	143.213
0.0000				
Within	8	0.648	0.081	
-----				
Total	11	35.427		

Coefficient of Variation = 11.73%

Var.	VARIABLE No. 15	Sum	Average	SD	SE
1	Number				
1	3.00	16.020	5.340	0.14	0.16
2	3.00	3.920	1.307	0.09	0.16
3	3.00	3.560	1.187	0.47	0.16
4	3.00	5.600	1.867	0.27	0.16
-----					
Total	12.00	29.100	2.425	1.79	0.52
Within			0.28		
Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	5.340	A	Mean 1 =	5.340	A
Mean 2 =	1.310	B	Mean 4 =	1.870	B
Mean 3 =	1.190	B	Mean 2 =	1.310	B
Mean 4 =	1.870	B	Mean 3 =	1.190	B

**Variable 16 (14)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	19.952	6.651	47.617
0.0000				
Within	8	1.117	0.140	
-----				
Total	11	21.069		

Coefficient of Variation = 11.20%

Var.	VARIABLE No. 16	Sum	Average	SD	SE
1	Number				
1	3.00	15.550	5.183	0.46	0.22
2	3.00	11.450	3.817	0.15	0.22
3	3.00	5.341	1.780	0.47	0.22

4	3.00	7.710	2.570	0.33	0.22
-----					
Total	12.00	40.051	3.338	1.38	0.40
Within			0.37		
Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	5.180	A	Mean 1 =	5.180	A
Mean 2 =	3.820	B	Mean 2 =	3.820	B
Mean 3 =	1.780	C	Mean 4 =	2.570	C
Mean 4 =	2.570	C	Mean 3 =	1.780	C

**Variable 17 (15)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	68.377	22.792	206.249
0.0000				
Within	8	0.884	0.111	
-----				
Total	11	69.261		

Coefficient of Variation = 8.38%

Var.	VARIABLE No. 17	Sum	Average	SD	SE
1	Number				
1	3.00	23.720	7.907	0.07	0.19
2	3.00	11.470	3.823	0.16	0.19
3	3.00	6.700	2.233	0.64	0.19
4	3.00	5.720	1.907	0.03	0.19
-----					
Total	12.00	47.610	3.967	2.51	0.72
Within			0.33		
Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	7.910	A	Mean 1 =	7.910	A
Mean 2 =	3.820	B	Mean 2 =	3.820	B
Mean 3 =	2.330	C	Mean 3 =	2.330	C
Mean 4 =	1.910	C	Mean 4 =	1.910	C

**Variable 18 (16)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	103.937	34.646	521.971
0.0000				
Within	8	0.531	0.066	
-----				
Total	11	104.468		

Coefficient of Variation = 5.65%

Var.	VARIABLE No. 18	Sum	Average	SD	SE
1	Number				
1	3.00	28.440	9.480	0.19	0.15
2	3.00	12.500	4.167	0.18	0.15
3	3.00	7.390	2.463	0.44	0.15
4	3.00	6.400	2.133	0.07	0.15

Total 12.00 54.730 4.561 3.08 0.89  
 Within 0.26  
 Original Order Ranked Order

Mean 1 = 9.480 A Mean 1 = 9.480 A  
 Mean 2 = 4.170 B Mean 2 = 4.170 B  
 Mean 3 = 2.460 C Mean 3 = 2.460 C  
 Mean 4 = 2.130 C Mean 4 = 2.130 C

**Variable 19 (17)**

## ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	181.226	60.409	79.882
0.0000				
Within	8	6.050	0.756	
-----				
Total	11	187.276		

Coefficient of Variation = 15.36%

Var.	VARIABLE No. 19	Number	Sum	Average	SD	SE
-----						
1	3.00	35.940	11.980	0.25	1.69	0.50
2	3.00	17.200	5.733	0.31	0.25	0.50
3	3.00	8.110	2.703	0.06	0.31	0.50
4	3.00	6.710	2.237		0.06	0.50
-----						
Total	12.00	67.960	5.663		4.13	1.19
Within					0.87	

Original Order Ranked Order

Mean 1 = 11.98 A Mean 1 = 11.98 A  
 Mean 2 = 5.730 B Mean 2 = 5.730 B  
 Mean 3 = 2.700 C Mean 3 = 2.700 C  
 Mean 4 = 2.240 C Mean 4 = 2.240 C

**Variable 20 (18)**

## ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	284.554	94.851	155.019
0.0000				
Within	8	4.895	0.612	
-----				

**Xử lý Anova – hàm lượng NO<sub>3</sub> của các nghiệm thức ương nuôi tôm giai đoạn post 5 trong bể**

Function: ANOVA-1  
 Data case no. 1 to 12

One way ANOVA grouped over variable 1 (NT)  
 with values from 1 to 4.

**Variable 3 (1)**

## ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	0.025	0.008	4.385
0.0420				
Within	8	0.015	0.002	
-----				

Total 11 289.448

Coefficient of Variation = 11.31%

Var.	VARIABLE No. 20	Number	Sum	Average	SD	SE
-----						
1	3.00	44.380	14.793	1.35	0.45	
2	3.00	21.300	7.100	0.65	0.45	
3	3.00	9.810	3.270	0.19	0.45	
4	3.00	7.510	2.503	0.42	0.45	
-----						
Total	12.00	83.000	6.917		5.13	1.48
Within					0.78	

Original Order Ranked Order

Mean 1 = 14.79 A Mean 1 = 14.79 A  
 Mean 2 = 7.100 B Mean 2 = 7.100 B  
 Mean 3 = 3.270 C Mean 3 = 3.270 C  
 Mean 4 = 2.500 C Mean 4 = 2.500 C

**Variable 21 (19)**

## ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	306.187	102.062	434.771
0.0000				
Within	8	1.878	0.235	
-----				
Total	11	308.065		

Coefficient of Variation = 6.61%

Var.	VARIABLE No. 21	Number	Sum	Average	SD	SE
-----						
1	3.00	46.750	15.583	0.94	0.28	
2	3.00	21.950	7.317	0.11	0.28	
3	3.00	9.960	3.320	0.12	0.28	
4	3.00	9.310	3.103	0.18	0.28	
-----						
Total	12.00	87.970	7.331		5.29	1.53
Within					0.48	

Original Order Ranked Order

Mean 1 = 15.58 A Mean 1 = 15.58 A  
 Mean 2 = 7.310 B Mean 2 = 7.310 B  
 Mean 3 = 3.320 C Mean 3 = 3.320 C  
 Mean 4 = 3.100 C Mean 4 = 3.100 C

Prob.	Freedom	Squares	Square	F-value
-----				
Between	3	0.025	0.008	4.385
0.0420				
Within	8	0.015	0.002	
-----				

Total 11 0.039

Coefficient of Variation = 8.54%

Var. 1	VARIABLE No. 3	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	1.310	0.437	0.01	0.02	
2	3.00	1.580	0.527	0.07	0.02	
3	3.00	1.680	0.560	0.02	0.02	
4	3.00	1.500	0.500	0.05	0.02	

Total 12.00 6.070 0.506 0.06 0.02  
 Within 0.04

Original Order                  Ranked Order

Mean 1 = 0.4400 B    Mean 3 = 0.5600 A  
 Mean 2 = 0.5300 A    Mean 2 = 0.5300 A  
 Mean 3 = 0.5600 A    Mean 4 = 0.5000 AB  
 Mean 4 = 0.5000 AB    Mean 1 = 0.4400 B

**Variable 4 (2)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
Between	3	1.581	0.527	56.353
Within	8	0.075	0.009	

Total 11 1.655

Coefficient of Variation = 4.02%

Var. 1	VARIABLE No. 4	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	8.760	2.920	0.04	0.06	
2	3.00	7.570	2.523	0.15	0.06	
3	3.00	6.710	2.237	0.05	0.06	
4	3.00	5.810	1.937	0.10	0.06	

Total 12.00 28.850 2.404 0.39 0.11  
 Within 0.10

Original Order                  Ranked Order

Mean 1 = 2.920 A    Mean 1 = 2.920 A  
 Mean 2 = 2.520 B    Mean 2 = 2.520 B  
 Mean 3 = 2.240 C    Mean 3 = 2.240 C  
 Mean 4 = 1.940 D    Mean 4 = 1.940 D

**Variable 5 (3)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-------	--------------------	----------------	-------------	---------

Between 3 1.027 0.342 6.938  
 0.0129

Within 8 0.395 0.049

Total 11 1.422

Coefficient of Variation = 8.90%

Var. 1	VARIABLE No. 5	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	7.630	2.543	0.28	0.13	
2	3.00	7.840	2.613	0.33	0.13	
3	3.00	8.420	2.807	0.03	0.13	
4	3.00	6.050	2.017	0.10	0.13	

Total 12.00 29.940 2.495 0.36 0.10  
 Within 0.22

Original Order                  Ranked Order

Mean 1 = 2.540 A    Mean 3 = 2.810 A  
 Mean 2 = 2.610 A    Mean 2 = 2.610 A  
 Mean 3 = 2.810 A    Mean 1 = 2.540 A  
 Mean 4 = 2.020 B    Mean 4 = 2.020 B

**Variable 6 (4)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
Between	3	1.569	0.523	9.440
Within	8	0.443	0.055	

Total 11 2.012

Coefficient of Variation = 8.66%

Var. 1	VARIABLE No. 6	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	7.350	2.450	0.43	0.14	
2	3.00	9.350	3.117	0.16	0.14	
3	3.00	9.090	3.030	0.11	0.14	
4	3.00	6.830	2.277	0.04	0.14	

Total 12.00 32.620 2.718 0.43 0.12  
 Within 0.24

Original Order                  Ranked Order

Mean 1 = 2.450 BC    Mean 2 = 3.120 A  
 Mean 2 = 3.120 A    Mean 3 = 3.030 AB  
 Mean 3 = 3.030 AB    Mean 1 = 2.450 BC  
 Mean 4 = 2.280 C    Mean 4 = 2.280 C

**Variable 7 (5)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	0.770	0.257	18.181
0.0006				
Within	8	0.113	0.014	
-----				
Total	11	0.883		

Coefficient of Variation = 4.69%

Var. 1	VARIABLE No. 7 Number	Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	6.740	2.247	0.14	0.07
2	3.00	8.460	2.820	0.17	0.07
3	3.00	8.240	2.747	0.05	0.07
4	3.00	6.950	2.317	0.07	0.07
-----					
Total	12.00	30.390	2.533	0.28	0.08
Within			0.12		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 2.250 B    Mean 2 = 2.820 A  
 Mean 2 = 2.820 A    Mean 3 = 2.750 A  
 Mean 3 = 2.750 A    Mean 4 = 2.320 B  
 Mean 4 = 2.320 B    Mean 1 = 2.250 B

**Variable 8 (6)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	2.315	0.772	4.949
0.0314				
Within	8	1.247	0.156	
-----				
Total	11	3.562		

Coefficient of Variation = 12.71%

Var. 1	VARIABLE No. 8 Number	Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	11.360	3.787	0.72	0.23
2	3.00	9.430	3.143	0.14	0.23
3	3.00	7.760	2.587	0.29	0.23
4	3.00	8.740	2.913	0.03	0.23
-----					
Total	12.00	37.290	3.108	0.57	0.16
Within			0.39		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 3.790 A    Mean 1 = 3.790 A  
 Mean 2 = 3.140 AB    Mean 2 = 3.140 AB  
 Mean 3 = 2.590 B    Mean 4 = 2.910 B  
 Mean 4 = 2.910 B    Mean 3 = 2.590 B

**Variable 9 (7)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	2.615	0.872	63.474
0.0000				
Within	8	0.110	0.014	
-----				
Total	11	2.725		

Coefficient of Variation = 3.37%

Var. 1	VARIABLE No. 9 Number	Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	12.790	4.263	0.11	0.07
2	3.00	10.220	3.407	0.15	0.07
3	3.00	9.430	3.143	0.12	0.07
4	3.00	9.320	3.107	0.09	0.07
-----					
Total	12.00	41.760	3.480	0.50	0.14
Within			0.12		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 4.260 A    Mean 1 = 4.260 A  
 Mean 2 = 3.410 B    Mean 2 = 3.410 B  
 Mean 3 = 3.140 B    Mean 3 = 3.140 B  
 Mean 4 = 3.110 B    Mean 4 = 3.110 B

**Variable 10 (8)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	2.700	0.900	19.127
0.0005				
Within	8	0.376	0.047	
-----				
Total	11	3.076		

Coefficient of Variation = 6.34%

Var. 1	VARIABLE No. 10 Number	Sum	Average	SD	SE
-----					
1	3.00	12.290	4.097	0.26	0.13
2	3.00	10.890	3.630	0.34	0.13
3	3.00	9.160	3.053	0.06	0.13
4	3.00	8.720	2.907	0.06	0.13



Total	12.00	41.060	3.422	0.53	0.15
Within			0.22		

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 =	4.100 A	Mean 1 =	4.100 A
Mean 2 =	3.630 AB	Mean 2 =	3.630 AB
Mean 3 =	3.050 BC	Mean 3 =	3.050 BC
Mean 4 =	2.910 C	Mean 4 =	2.910 C

**Variable 11 (9)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	5.858	1.953	56.946
0.0000				
Within	8	0.274	0.034	
-----				
Total	11	6.133		

Coefficient of Variation = 4.66%

Var.	VARIABLE	No. 11			
1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	14.250	4.750	0.31	0.11
2	3.00	12.560	4.187	0.15	0.11
3	3.00	12.340	4.113	0.10	0.11
4	3.00	8.520	2.840	0.07	0.11
Total	12.00	47.670	3.973	0.75	0.22
Within			0.19		

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 =	4.750 A	Mean 1 =	4.750 A
Mean 2 =	4.190 B	Mean 2 =	4.190 B
Mean 3 =	4.110 B	Mean 3 =	4.110 B
Mean 4 =	2.840 C	Mean 4 =	2.840 C

**Variable 12 (10)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	8.059	2.686	21.804
0.0003				
Within	8	0.986	0.123	
-----				
Total	11	9.044		

Coefficient of Variation = 7.97%

Var.	VARIABLE	No. 12			
1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	16.480	5.493	0.19	0.20
2	3.00	14.280	4.760	0.67	0.20
3	3.00	12.290	4.097	0.11	0.20
4	3.00	9.820	3.273	0.03	0.20
Total	12.00	52.870	4.406	0.91	0.26
Within			0.35		

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 =	5.490 A	Mean 1 =	5.490 A
Mean 2 =	4.760 AB	Mean 2 =	4.760 AB
Mean 3 =	4.100 BC	Mean 3 =	4.100 BC
Mean 4 =	3.270 C	Mean 4 =	3.270 C

**Variable 13 (11)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	32.172	10.724	129.911
0.0000				
Within	8	0.660	0.083	
-----				
Total	11	32.833		

Coefficient of Variation = 5.69%

Var.	VARIABLE	No. 13			
1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	20.720	6.907	0.11	0.17
2	3.00	19.360	6.453	0.48	0.17
3	3.00	10.410	3.470	0.27	0.17
4	3.00	10.120	3.373	0.10	0.17
Total	12.00	60.610	5.051	1.73	0.50
Within			0.29		

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 =	6.910 A	Mean 1 =	6.910 A
Mean 2 =	6.450 A	Mean 2 =	6.450 A
Mean 3 =	3.470 B	Mean 3 =	3.470 B
Mean 4 =	3.370 B	Mean 4 =	3.370 B

**Variable 14 (12)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	35.189	11.730	19.689
0.0005				
Within	8	4.766	0.596	
-----				

-----  
 ----  
 Total 11 39.955

Coefficient of Variation = 11.93%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 14 Sum	Average	SD	SE
1	3.00	26.290	8.763	1.19	0.45
2	3.00	21.290	7.097	0.96	0.45
3	3.00	17.900	5.967	0.18	0.45
4	3.00	12.170	4.057	0.07	0.45
-----					
Total	12.00	77.650	6.471	1.91	0.55
Within			0.77		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 8.760 A    Mean 1 = 8.760 A  
 Mean 2 = 7.100 AB    Mean 2 = 7.100 AB  
 Mean 3 = 5.970 BC    Mean 3 = 5.970 BC  
 Mean 4 = 4.060 C    Mean 4 = 4.060 C

**Variable 15 (13)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	76.708	25.569	313.669
0.0000				
Within	8	0.652	0.082	
-----				

-----  
 ----  
 Total 11 77.360

Coefficient of Variation = 3.98%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 15 Sum	Average	SD	SE
1	3.00	32.760	10.920	0.48	0.16
2	3.00	15.920	5.307	0.25	0.16
3	3.00	24.100	8.033	0.13	0.16
4	3.00	13.410	4.470	0.13	0.16
-----					
Total	12.00	86.190	7.183	2.65	0.77
Within			0.29		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 10.92 A    Mean 1 = 10.92 A  
 Mean 2 = 5.310 C    Mean 3 = 8.030 B  
 Mean 3 = 8.030 B    Mean 2 = 5.310 C  
 Mean 4 = 4.470 D    Mean 4 = 4.470 D

**Variable 16 (14)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
--------------------	----------------	-------------

Prob.	Freedom	Squares	Square	F-value
-----				
Between	3	134.710	44.903	204.789
0.0000				
Within	8	1.754	0.219	
-----				
-----				
Total	11	136.464		
Coefficient of Variation = 5.21%				

Var. 1	VARIABLE Number	No. 16 Sum	Average	SD	SE
1	3.00	43.380	14.460	0.52	0.27
2	3.00	24.970	8.323	0.78	0.27
3	3.00	23.470	7.823	0.04	0.27
4	3.00	16.080	5.360	0.07	0.27
-----					
Total	12.00	107.900	8.992	3.52	1.02
Within			0.47		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 14.46 A    Mean 1 = 14.46 A  
 Mean 2 = 8.320 B    Mean 2 = 8.320 B  
 Mean 3 = 7.820 B    Mean 3 = 7.820 B  
 Mean 4 = 5.360 C    Mean 4 = 5.360 C

**Variable 17 (15)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	524.957	174.986	257.515
0.0000				
Within	8	5.436	0.680	
-----				

-----  
 ----  
 Total 11 530.393

Coefficient of Variation = 7.45%

Var. 1	VARIABLE Number	No. 17 Sum	Average	SD	SE
1	3.00	66.920	22.307	1.62	0.48
2	3.00	28.060	9.353	0.15	0.48
3	3.00	20.370	6.790	0.27	0.48
4	3.00	17.490	5.830	0.07	0.48
-----					
Total	12.00	132.840	11.070	6.94	2.00
Within			0.82		

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 22.31 A    Mean 1 = 22.31 A  
 Mean 2 = 9.350 B    Mean 2 = 9.350 B  
 Mean 3 = 6.790 C    Mean 3 = 6.790 C  
 Mean 4 = 5.830 C    Mean 4 = 5.830 C

**Variable 18 (16)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	1350.201	450.067	734.603
0.0000				
Within	8	4.901	0.613	
-----				
Total	11	1355.102		

Coefficient of Variation = 5.11%

Var. 1	VARIABLE No. 18	Number	Sum	Average	SD	SE
-----						
1	3.00	100.890	33.630	1.41	0.45	
2	3.00	32.300	10.767	0.59	0.45	
3	3.00	26.200	8.733	0.30	0.45	
4	3.00	24.600	8.200	0.17	0.45	
-----						
Total	12.00	183.990	15.332	11.10		
3.20						
Within			0.78			
Original Order			Ranked Order			

Mean 1 = 33.63 A    Mean 1 = 33.63 A  
 Mean 2 = 10.77 B    Mean 2 = 10.77 B  
 Mean 3 = 8.730 BC    Mean 3 = 8.730 BC  
 Mean 4 = 8.200 C    Mean 4 = 8.200 C

**Variable 19 (17)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	2308.230	769.410	735.018
0.0000				
Within	8	8.374	1.047	
-----				
Total	11	2316.604		

Coefficient of Variation = 5.71%

Var. 1	VARIABLE No. 19	Number	Sum	Average	SD	SE
-----						
1	3.00	124.790	41.597	1.99	0.59	
2	3.00	40.900	13.633	0.43	0.59	
3	3.00	27.540	9.180	0.06	0.59	
4	3.00	21.720	7.240	0.15	0.59	
-----						
Total	12.00	214.950	17.913	14.51		
4.19						
Within			1.02			
Original Order			Ranked Order			

Mean 1 = 41.60 A    Mean 1 = 41.60 A  
 Mean 2 = 13.63 B    Mean 2 = 13.63 B  
 Mean 3 = 9.180 C    Mean 3 = 9.180 C  
 Mean 4 = 7.240 C    Mean 4 = 7.240 C

**Variable 20 (18)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	3721.517	1240.506	1234.335
0.0000				
Within	8	8.040	1.005	
-----				
Total	11	3729.557		

Coefficient of Variation = 4.59%

Var. 1	VARIABLE No. 20	Number	Sum	Average	SD	SE
-----						
1	3.00	156.220	52.073	1.61	0.58	
2	3.00	45.650	15.217	1.15	0.58	
3	3.00	33.450	11.150	0.14	0.58	
4	3.00	26.600	8.867	0.28	0.58	
-----						
Total	12.00	261.920	21.827	18.41		
5.32						
Within			1.00			

Original Order                      Ranked Order

Mean 1 = 52.07 A    Mean 1 = 52.07 A  
 Mean 2 = 15.22 B    Mean 2 = 15.22 B  
 Mean 3 = 11.15 C    Mean 3 = 11.15 C  
 Mean 4 = 8.870 C    Mean 4 = 8.870 C

**Variable 21 (19)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE				
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value
-----				
Between	3	5073.982	1691.327	4452.421
0.0000				
Within	8	3.039	0.380	
-----				
Total	11	5077.021		

Coefficient of Variation = 2.38%

Var. 1	VARIABLE No. 21	Number	Sum	Average	SD	SE
-----						
1	3.00	183.340	61.113	0.97	0.36	
2	3.00	55.530	18.510	0.68	0.36	

	3	3.00	41.590	13.863	0.33	0.36
	4	3.00	30.090	10.030	0.07	0.36
-----						
Total	12.00		310.550	25.879		21.48
6.20						
Within				0.62		

**Xử lý Anova – Tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm**

Function: ANOVA-1

Data case no. 1 to 12

**Variable 4 (WG)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE					
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	
-----					
Between	3	0.107	0.036	15.579	
0.0011					
Within	8	0.018	0.002		
-----					
Total	11	0.126			

Coefficient of Variation = 8.40%

Var.	VARIABLE No. 4			SD	SE
1	Number	Sum	Average		
1	3.00	1.330	0.443	0.06	0.03
2	3.00	2.010	0.670	0.04	0.03
3	3.00	1.960	0.653	0.04	0.03
4	3.00	1.550	0.517	0.06	0.03
-----					
Total	12.00	6.850	0.571	0.11	0.03
Within				0.05	

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 0.4400 B	Mean 2 = 0.6700 A
Mean 2 = 0.6700 A	Mean 3 = 0.6500 A
Mean 3 = 0.6500 A	Mean 4 = 0.5200 B
Mean 4 = 0.5200 B	Mean 1 = 0.4400 B

**Variable 5 (SGR)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE					
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	
-----					
Between	3	7.608	2.536	10.886	
0.0034					
Within	8	1.864	0.233		
-----					
Total	11	9.471			

Coefficient of Variation = 3.07%

Var.	VARIABLE No. 5			SD	SE
1	Number	Sum	Average		

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 61.11 A	Mean 1 = 61.11 A
Mean 2 = 18.51 B	Mean 2 = 18.51 B
Mean 3 = 13.86 C	Mean 3 = 13.86 C
Mean 4 = 10.03 D	Mean 4 = 10.03 D

Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	
-----					
1	3.00	44.100	14.700	0.64	0.28
2	3.00	49.840	16.613	0.48	0.28
3	3.00	49.160	16.387	0.20	0.28
4	3.00	45.650	15.217	0.50	0.28
-----					
Total	12.00	188.750	15.729	0.93	0.27
Within				0.48	

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 14.70 C	Mean 2 = 16.61 A
Mean 2 = 16.61 A	Mean 3 = 16.38 AB
Mean 3 = 16.38 AB	Mean 4 = 15.22 BC
Mean 4 = 15.22 BC	Mean 1 = 14.70 C

**Variable 6 (Tỷ lệ sống)**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE					
Prob.	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	
-----					
Between	3	1505.071	501.690	24.730	
0.0002					
Within	8	162.297	20.287		
-----					
Total	11	1667.367			

Coefficient of Variation = 5.49%

Var.	VARIABLE No. 6			SD	SE
1	Number	Sum	Average		
1	3.00	269.900	89.967	2.03	2.60
2	3.00	238.900	79.633	7.75	2.60
3	3.00	281.600	93.867	1.73	2.60
4	3.00	194.750	64.917	3.75	2.60
-----					
Total	12.00	985.150	82.096	12.31	
3.55					
Within				4.50	

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 89.97 AB	Mean 3 = 93.87 A
Mean 2 = 79.63 B	Mean 1 = 89.97 AB
Mean 3 = 93.87 A	Mean 2 = 79.63 B
Mean 4 = 64.92 C	Mean 4 = 64.92 C