

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

TRƯƠNG 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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TP. HCM - Năm 2022

Công trình được hoàn thành tại:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Phú Hòa
PGS.TS. Phạm Công Hoạt

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp
Trường

họp tại: Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Vào hồigiờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
- Thư viện Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

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 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, 2020). 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.

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. 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. 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 NH_3 hầu hết vượt tiêu chuẩn cho phép, 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).

Việc phân lập và tuyển chọn vi sinh vật chuyển 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 chuyển hóa nitơ của các chủng vi sinh vật ở ao nuôi tôm thẻ 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 bề 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, 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, 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, nitrite phân lập từ bùn ở nền đáy vùng nuôi tôm hùm Vịnh Xuân Đài, Phú Yên.

Tạo chế phẩm vi khuẩn dạng lỏng và sản xuất 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 ở phòng thí nghiệm và trong mô hình nuôi ương giống tôm thẻ chân trắng giai đoạn post 5 ở bể 1m³.

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 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* T₉ có khả năng chuyên hóa các hợp chất ammonia, nitrite, nitrate.

Luận án đã xây dựng được qui 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 Sơ đồ chu trình chuyển hóa nitơ trong hệ sinh thái biển

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 CO₂, nước và các muối dinh dưỡng trong đó có Amoni, Nitrit và Nitrat của môi trường để tổng hợp chất hữu cơ.

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 phân 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 bán chất quần thể Zooplankton.

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 phân 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.

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 Ôxy, nước.

1.2. 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). Khi cơ thể sinh vật chết đi, các chất hữu cơ chứa nitơ sẽ bị thối rửa và amôn hoá dưới tác dụng của các vi sinh vật thành NH_3 hay NH_4^+ . Dạng NH_4^+ sẽ bị chuyển hoá thành dạng

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.

1.3. Đặc điểm của các nhóm vi khuẩn tham gia quá trình chuyển hóa Nitơ

1.3.1. 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.

1.3.2. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn *Rhodococcus*

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.

1.3.3. 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.

1.3.4. 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 ctvl, 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.

1.3.5. 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*.

Alcaligenes faecalis là một loài vi khuẩn Gram âm, hình que thường được tìm thấy trong môi trường.

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.

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 nitrite thành nitrate.

1.4. Tình hình nghiên cứu ứng dụng của vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản trong nước và ngoài nước.

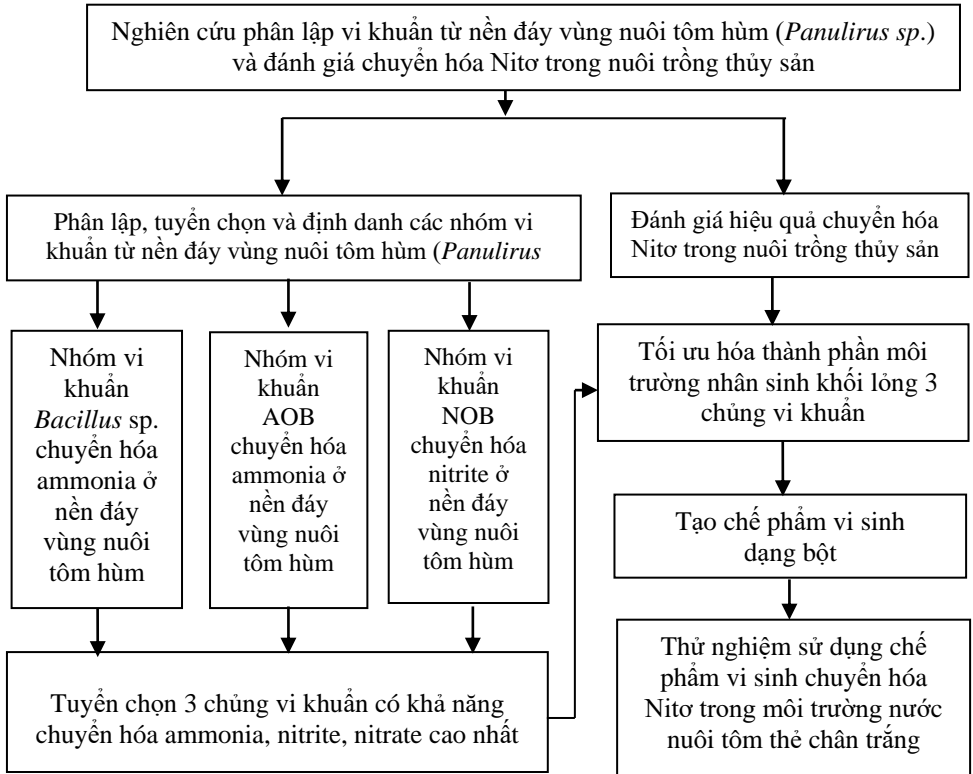
Năm 2017, Hoàng Hà Phương và ctv, tạo chế phẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn nitrate hóa có hiệu quả chuyển hóa ammoni trên 95% trong hệ lọc ở điều kiện phòng thí nghiệm, và ứng dụng thành công tại đầm, ao nuôi trồng thủy sản của các Tỉnh Thanh Hóa và Sóc Trăng với hàm lượng TAN luôn thấp hơn 0,1mg/L 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).

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*.

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

Luận án được thực hiện từ tháng 8/2016 đến tháng 08/2020 tại Đại Học Nông Lâm Tp.HCM.

2.3. Thu mẫu bùn

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, được phân tích các chỉ tiêu pH, độ mặn, ammonia, nitrite, nitrate, N tổng.

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) có bổ sung NaCl ở các nồng độ 1,5%, 2%, 2,5%, 3% và 3,5%.

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 trong 48 giờ, được đem đi kiểm tra khả năng xử lý ammonia.

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

Phương pháp nhuộm Gram và thực hiện khóa phân loại bergey.

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

Khuếch đại vùng gen mục tiêu bằng phản ứng PCR: được thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi chung vùng 16S - rRNA 27F (5' AGATTTGATCCTGGCTCAG3') và 1492R(5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Tim Schuurman và ctv, 2004).

Xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm MEGA X theo phương pháp Neighbor Joining với hệ số bootstrap là 1000 (Kurma, 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

Môi trường phân lập vi khuẩn: môi trường ammonium-calcium-carbonate có bổ sung muối NaCl 1,5%, 2%, 2,5%, 3% và 3,5%.

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 pha loãng thành các nồng độ và chuyển vào môi trường ammonium – calcium – carbonate có bổ sung NaCl, được ủ trong tối ở 28 °C trên máy lắc khoảng 21 ngày. Sau khi ủ, kiểm tra sự hiện diện của NO₂⁻ bằng thuốc thử Griess – Iloway.

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.

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.

Nuôi tăng sinh và phân lập vi khuẩn: dung dịch huyền phù vi khuẩn được chuyển vào môi trường ammonium – calcium – carbonate, ủ trong

bóng tối ở 28 °C, lắc trong 3 tuần. Sau 3 ngày, kiểm tra sự có mặt của NO₂⁻ ở các ống môi trường bằng thuốc thử Griess - Ilosway và mỗi tuần kiểm tra khả năng nhiễm vi khuẩn dị dưỡng trong các ống đó bằng môi trường phân lập vi khuẩn TSA có bổ sung NaCl.

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.

Phương pháp sử dụng kit API 20 E và API 20NE: thực hiện các phản ứng sinh hóa theo hướng dẫn của hãng Biomerieux, Pháp (The global health network, 2013).

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

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

Xây dựng cây phả hệ : 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 có bổ sung muối NaCl 1,5%, 2%, 2,5%, 3% và 3,5%.

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.

Xác định dương tính đối với nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite: Thực hiện các bước như mục 2.4.2.2.

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.

2.4.3.3. Phương pháp định danh sinh hóa vi khuẩn NOB

Phương pháp nhuộm Gram, 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

2.4.3.4. Phương pháp định danh sinh học phân tử vi khuẩn NOB: thực hiện như 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 10^7 CFU/ml, sau đó bổ sung vào môi trường định lượng ammonia có chứa NH_4^+ 10mg/l, môi trường định lượng nitrite có chứa NO_2^- 0,53 mg/l, môi trường Nitrate Broth với hàm lượng NO_3^- 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_2^- , NO_3^-).

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 bổ sung các nồng độ muối NaCl khác nhau 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%.

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

Chọn 3 loại môi trường tăng sinh: TSB, NB, LB. Sau 24 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, đếm mật độ khuẩn lạc để chọn lọc môi trường tăng sinh tối ưu cho từng chủng vi khuẩn.

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

Chọn tỷ lệ giống 1% có mật độ vi khuẩn thay đổi 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml, 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.

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

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.

Với tỷ lệ nạp giống lần lượt là 1,0%, 2,5%, 3,5%, và 5,0%, lắc nuôi vi khuẩn 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.

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.

Khảo sát các mức 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, khảo sát pH ở 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.

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.

Với 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, (NH₄)₂SO₄ và NaNO₃ với 10 g/L.

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,

Rhodococcus rhodochrous T₉

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. Các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là mật rỉ đường, cao nấm men, K₂HPO₄, MgSO₄, NaCl và CaCl₂, mỗi yếu tố đã được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1).

Đối với vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous T₉*, các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là glucose, pepton, K₂HPO₄, MgSO₄, NaCl và CaCl₂, mỗi yếu tố đã được kiểm tra ở hai cấp độ mức thấp (-1) và mức cao (+1).

Tối ưu hóa các thành phần môi trường lên men vi khuẩn Bacillus licheniformis B85 và Pseudomonas stutzeri KL15, Rhodococcus rhodochrous T₉ 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).

Đối với vi khuẩn Bacillus licheniformis B85 và Pseudomonas stutzeri KL15: 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, được ký hiệu lần lượt là A (Mật rỉ đường), B (Cao nấm men), C (MgSO₄), C'(NaCl).

Đối với vi khuẩn Rhodococcus rhodochrous T₉: 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 được ký hiệu là A' (Glucose), B' (Cao nấm men), C'(NaCl).

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

Môi trường bán rắn có chứa cám gạo, cám bắp, cám mì và bã đậu nành được khảo sát để chọn ra tỷ lệ nạt giống tốt nhất.

Khảo sát tỷ lệ nạt giống ảnh hưởng đến mật độ các chủng vi khuẩn

Khảo sát tỷ lệ nạt giống vi khuẩn là 2,5%, 5%, 7,5% và 10% (mật độ vi khuẩn 10⁸ CFU/mL), để chọn ra tỷ lệ nạt giống tốt nhất.

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

Khảo sát độ ẩm nuôi cấy các chủng vi khuẩn là 45%, 50%, 55%, 60%,

ủ ở nhiệt độ 30°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

Khảo sát thời gian nuôi cấy với mốc thời gian 36, 48, 60, 72, 84, 96 giờ, ở nhiệt độ 30°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° C), nhiệt độ tủ mát (4 -8°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 trồng tôm thẻ chân trắng ở qui mô phòng thí nghiệm

Mẫu nước của ao nuôi tôm thẻ chân trắng (không có tôm thí nghiệm) được bổ sung các tỷ lệ chế phẩm vi sinh vật có mật độ 10^8 CFU/gam vào các can 20L, 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.

2.6.2. Đánh giá sự chuyển hóa N của các chủng vi khuẩn trong bể nuôi trồng tôm thẻ chân trắng ở qui mô phòng 1m³

Từ thí nghiệm 3.6.1, chọn ra được ba tỷ lệ vi sinh thích hợp với mật độ 10^8 CFU/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%

2.7. 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/mL trước khi phân tích thống kê. So sánh thống kê bằng phương pháp phân tích phương sai 1 nhân tố 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

Kết quả phân tích của các mẫu bùn này cho thấy hàm lượng các chỉ tiêu môi trường như pH, độ mặn, ammonia, nitrite, nitrate và N tổng trong 12 tháng đều nằm trong giới hạn cho phép các vi sinh vật AOB, NOB phát triển, tham gia vào quá trình chuyển hóa ammonia, nitrite trong nền đáy vùng nuôi tôm hùm ở Vịnh Xuân Đài và cũng phù hợp cho việc nuôi tôm hùm.

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 khuẩn lạc nghi ngờ là *Bacillus* sp.

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

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.

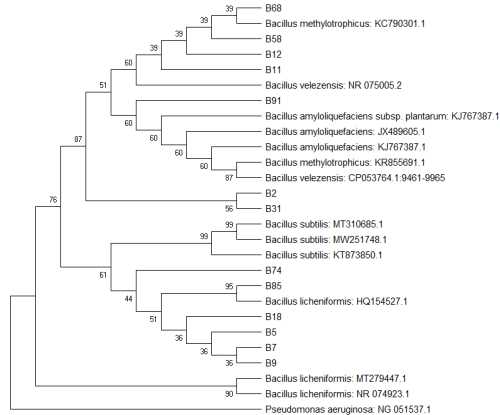
3.1.2.3. Kết quả định danh sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Dựa vào khóa phân loại Bergey, có thể bước đầu khẳng định 13 chủng vi khuẩn này là *Bacillus* sp., tuy nhiên kết quả sinh hóa vẫn chưa định danh đến loài mà chỉ xác định đến chi, do đó cần thực hiện phương pháp giải trình gen vùng 16S-rRNA để kết luận chính xác tên loài vi khuẩn.

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

Hình 3.1 cho thấy cây phả hệ cho thấy các chủng vi khuẩn đều thuộc chi *Bacillus* sp và không phát sinh loài mới, chứng tỏ các chủng vi khuẩn phân lập được đều thuộc chi *Bacillus* sp. Ở một nhánh phân loài, hệ số bootstrap của chủng vi khuẩn B85 với trình tự tham chiếu là *Bacillus licheniformis* là 95%. Do đó, 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 *Bacillus* đã được đưa vào Genbank.



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

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* đã được định danh (B2, B5, B7, B9, B11, B12, B18, B31, B58, B68, B74, B85, B91) trong môi trường định lượng có chứa NH_3/NH_4 . Các chủng vi khuẩn đều có khả năng chuyển hóa ammonia trong đó có 7 chủng chuyển hóa ammonia với hiệu suất từ 80% - 90% (B2, B7, B9, B11, B12, B18, B91) và 6 chủng vi khuẩn chuyển hóa trên 97% (B5, B31, B58, B68, B74 và B85).

3.1.3. Kết quả phân lập vi khuẩn chuyển hóa ammonia từ mẫu bùn

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

Sau khi kiểm tra sự hiện diện của nhóm vi khuẩn AOB trong 132 mẫu bùn, loại bỏ bớt các mẫu bùn có màu hồng nhạt và có mật độ vi khuẩn từ 10^1 - 10^2 MPN/gam, kết quả có 21 mẫu bùn có mật độ vi khuẩn nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonium (AOB).

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 bổ sung NaCl.

3.1.3.3. Kết quả xác định khả năng chuyển hóa NH_3 của các chủng vi

khuẩn

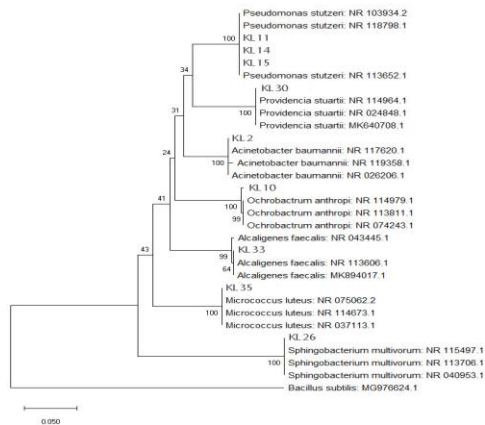
Trong 60 chủng vi khuẩn được khảo sát có 35 chủng có khả năng chuyển hóa ammonia, 25 chủng vi khuẩn không có khả năng chuyển hóa ammonia. Khả năng chuyển hóa của 35 chủng vi khuẩn sau 10 ngày ở các mức độ khác nhau, trong đó có 10 chủng vi khuẩn KL2, KL10, KL11, KL14, KL15, KL21, KL26, KL30, KL33, KL35 cho phản ứng màu vàng do sự có mặt của NO_2^- nên mức độ chuyển hóa ammonia mạnh.

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

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 KL21 thuộc các chi *Burkholderia* hoặc *Sphingomonas* và chủng vi khuẩn có ký hiệu KL26 là vi khuẩn *Sphingobacterium multivorum* với độ tương đồng là 99,9%.

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 oryzae* với độ tương đồng là 39,8%.

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



Hình 3.3 Cây phả hệ của các chủng vi khuẩn AOB

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%. Xác định KL2 là *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, KL10 chủng vi khuẩn *Ochrobactrum anthropi*, KL11, KL14, KL15 là chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri*, KL26 là vi khuẩn *Sphingobacterium multivorum*, KL30 là vi khuẩn *Providencia stuartii*, KL33 là *Alcaligenes faecalis*, KL35 là *Micrococcus luteus*. Các trình tự DNA của các chủng vi khuẩn đã được đưa vào Genbank làm dữ liệu so sánh.

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 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 NO_2^- . Kết quả vi khuẩn *Sphingobacterium 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.

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, chọn được 22 mẫu bùn có mật độ nhóm NOB từ 10^2 MPN/gam 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. 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, Sau khi nhuộm gram, 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 NO_2^- của các chủng vi khuẩn

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, C₂/1, C₂/2, C₃/1, C₄/2, C₈/1, C₉/1, C₁₀, TKT, T₁, T₂/2, T₃/1, T₄/1, T₅/3, T₇/3, T₉ khi phản ứng với bộ test kit cho phản ứng màu vàng do sự có mặt của NO_3^- nên mức độ chuyển hóa nitrite mạnh.

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

Sau khi chọn được 16 chủng vi khuẩn từ mục 4.4.3, 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 (-).

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

Cả 4 chủng vi khuẩn TKT, T₂/2, C₂/2, C₄/2 có độ tương đồng với chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* là 96,7%. Hai chủng vi khuẩn T₁, C₃/1 có độ tương đồng 99,7% với chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia*, 2 chủng vi khuẩn CKT và C₂/1 độ tương đồng 99,8% với chủng vi khuẩn *Chryseobacterium indologenes*.

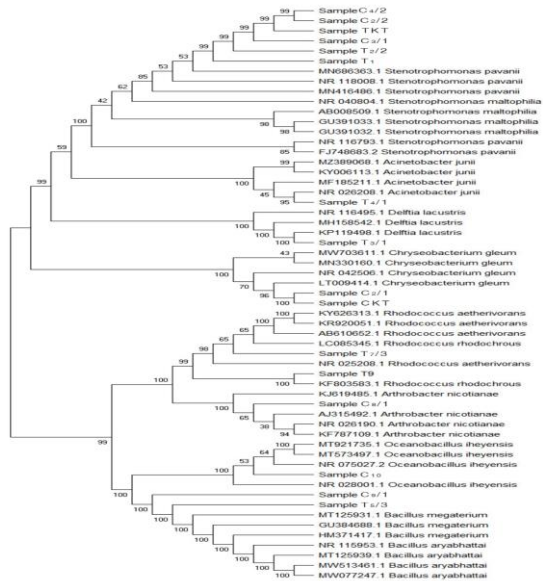
Chủng vi khuẩn T₃/1 có độ tương đồng 72,5% với chủng vi khuẩn *Delftia acidovorans*, chủng vi khuẩn T₄/1 này có độ tương đồng 90,9% với chủng vi khuẩn *Acinetobacter junii/johnsonii*.

Chủng vi khuẩn C₈/1 này có độ tương đồng 89,2% với chi vi khuẩn *Arthrobacter* spp., chủng vi khuẩn C₉/1 có độ tương đồng 98,7% với chi *Brevibacterium* spp., chủng vi khuẩn C₁₀ có độ tương đồng 99,5% với chủng vi khuẩn *Propionibacterium avidum*. Chủng vi khuẩn T₅/3 chỉ tương đồng với 68,5% với nhóm *Cellulomonas spp./Microbacterium* spp., chủng vi khuẩn T₇/3, T₉ tương đồng với nhóm vi khuẩn *Rhodococcus* spp lần lượt là 92,9% và 94,3%.

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

Dựa vào kết quả sinh hóa và kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cùng với cây phân nhóm di truyền 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, xác định chủng CKT và C₂/1 là *Chryseobacterium gleum*, chủng T₃/1 là *Delftia lacustris*, chủng ký hiệu T₄/1 là *Acinetobacter junii*, chủng vi khuẩn C₈/1 là *Arthrobacter nicotianae*, T₇/3 là *Rhodococcus*

aetherivorans và T₉ là *Rhodococcus rhodochrous*, C₃/1 và T₁ là *Stenotrophomonas maltophilia*, TKT, T₂/2, C₂/2, C₄/2 là *Stenotrophomonas pavanii*. Các trình tự DNA của các chủng vi khuẩn trên được đưa vào genbank như là nguồn dữ liệu cho nghiên cứu so sánh.



Hình 3.5 Cây phả hệ của các chủng vi khuẩn NOB

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

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, C₂/1, C₂/2, C₃/1, C₄/2, TKT, T₁, T₂/2, T₃/1, T₄/1, T₉ hiệu suất chuyển hóa nitrite trên 95%, chủng vi khuẩn T₂/2 có hiệu suất xử lý cao nhất (98,21%) và chủng thấp nhất là T₉ (95,05%).

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.

Từ 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%.

3.1.5.1. Khảo sát khả năng chuyển hóa NO₂⁻, NO₃⁻ và khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn *Bacillus*, vi khuẩn AOB.

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, tất cả các chủng vi khuẩn sống ở độ mặn từ 3-7%.

3.1.5.2. Khảo sát khả năng chuyển hóa NH_4^- và NO_3^- và khả năng chịu mặn của nhóm vi khuẩn NOB.

Chọn được 1 chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T₉ 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, sống ở độ mặn từ 3-7%.

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

Tóm lại, chủng vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T₉ 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

Ba chủng vi khuẩn *R.rhodochrous* T₉, *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* T₉ thì glucose và pepton.

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

Từ các dữ liệu thu được và phương trình hồi quy, mô hình dự đoán cũng 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), 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°C, 36 giờ, pH 7, tỷ lệ giống 2,5%.

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

Từ các dữ liệu thu được và phương trình hồi quy, các thông số tối ưu của mỗi thành phần môi trường được xác định như sau: mật rỉ đường 4,95 g/L, cao nấm men 19,08 g/L và MgSO₄ 1,13 g/L, mô hình trong phần mềm Design Expert 11 dự đoán mật độ vi khuẩn tối đa đạt $2,45 \times 10^{11}$ CFU/mL (11,60 Log.CFU/mL). 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.

Tối ưu hóa thành phần môi trường sản xuất sinh khối vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T₉

Từ các dữ liệu thu được và phương trình hồi quy, thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn *R. rhodochrous* T₉ 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 (10,467 Log.CFU/mL). Mật độ vi khuẩn *Rhodococcus rhodochrous* T₉ được nuôi thực nghiệm sau 36 giờ nuôi cấy, nhiệt độ 33 °C, tỷ lệ nạp giống là 2,5% là $2,52 \times 10^{10}$ CFU/mL (10,40 Log.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

Kết quả chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B85 phát triển tốt nhất trên môi trường là bã đậu nành, tỷ lệ nạp giống là 5%, độ ẩm là 55%, thời gian nuôi cấy là 60 giờ. Chủng vi khuẩn *P. stutzeri* KL15 phát triển tốt nhất trên môi trường có chất mang là cám bắp, tỷ lệ nạp giống là 7,5%, độ ẩm là 55%, thời gian nuôi cấy là 72 giờ. Chủng *Rhodococcus rhodochrous* T₉ phát triển tốt nhất trên môi trường là cám gạo, tỷ lệ nạp giống là 5%, độ ẩm là 55%, thời gian nuôi cấy là 72 giờ.

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°C - 45°C trong thời gian 2 -3 ngày, 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.

Bảng 3.21. 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 ₉	$1,8 \times 10^9$

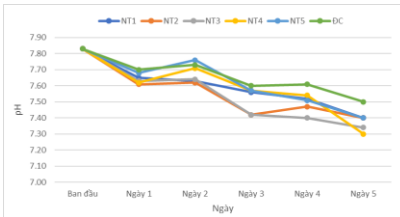
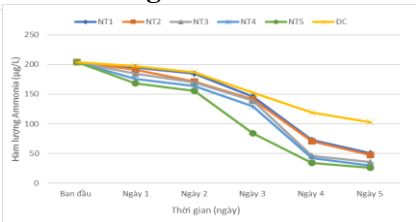
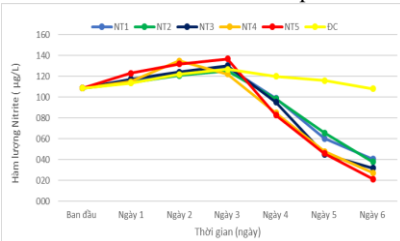
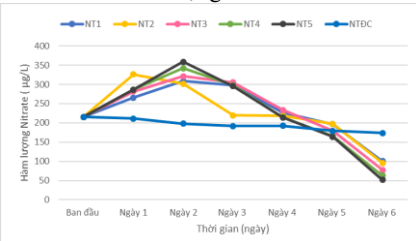
Khảo sát điều kiện bảo quản chế phẩm vi sinh

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..

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.

**Hình 3.33.** Chỉ tiêu pH**Hình 3.34.** Hàm lượng ammonia**Hình 3.35.** Hàm lượng nitrite**Hình 3.36.** Hàm lượng nitrate

Hàm lượng chế phẩm vi sinh thích hợp cần bổ sung vào bể nuôi tôm thẻ chân trắng qui mô 1m^3 để cải thiện hàm lượng ammonia là 10^8 CFU/g với liều lượng 0,3 % (82,04%), 0,4% (85,31%) và 0,5% (85,31%).

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

- **Tổng vi khuẩn hiếu khí**

Sau 5 ngày, NTĐC có tổng vi sinh vật 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.

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

Sau 5 ngày, 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.

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

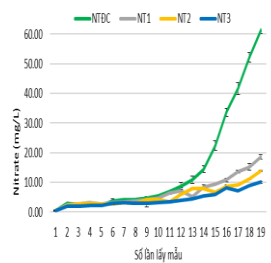
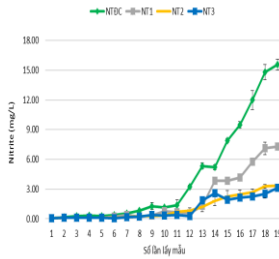
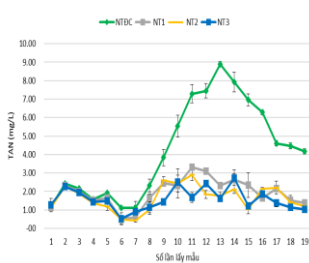
Sau 5 ngày, mật độ vi sinh NOB ở nghiệm thức NT1, NT2 còn $1,6 - 1,7 \times 10^2$ CFU/mL, NT3 là $2,1 \times 10^3$ CFU/mL, NT4, NT5 là $1,2 - 2,2 \times 10^4$ CFU/mL.

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

Các chỉ tiêu môi trường nước

Các chỉ tiêu môi trường nước nuôi tôm như nhiệt độ, pH, DO, độ mặn và độ kiềm nằm trong giới hạn cho phép, thích hợp cho tôm và hoạt động vi khuẩn chuyển hóa các hợp chất nitơ.

Khảo sát hàm lượng TAN, nitrite và nitrate trong bể nuôi tôm



Hình 3.40. Hàm lượng TAN **Hình 3.41.** Hàm lượng nitrite **Hình 3.42** Hàm lượng nitrate

Trong thời gian 30 ngày, TAN của 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. Hàm lượng nitrite có khoảng biến thiên hàm lượng Nitrite 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. Hàm lượng Nitrate khoảng biến thiên NO_3^- trong NT ĐC từ 0,44 - 61,11 mg/L, NT1 là 0,56 – 18,51 mg/L, NT2 là 0,56 – 13,86 ng/L, NT3 từ 0,50 – 10,03 mg/L, giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

Các chỉ tiêu vi sinh vật

Trong 30 ngày nuôi tôm, 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 *Vibrio* spp. dao động từ $10^3 - 10^6$ CFU/mL.

Đối với vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB) trong ao, mật độ vi khuẩn chuyển hóa ammonia dao động từ $7,3 \times 10^3$ cfu/mL – $9,1 \times 10^6$ cfu/mL. Mật độ vi khuẩn chuyển hóa nitrite (NOB) dao động từ 10^2 cfu/mL – 10^5 cfu/mL

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 NTĐC. Trong đó, tốc độ tăng trưởng và tăng trọng đạt cao nhất ở NT2, không có sự khác biệt có ý nghĩa với NT3 nhưng lại có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa NT1 và ĐC ($P < 0,01$). Tỷ lệ sống của NT3 cao nhất là 93,87% có sự khác biệt có ý nghĩa với NT ĐC và NT2, nhưng không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê với NT1.

Kết quả trong thử nghiệm cho thấy NT2, NT3 lần lượt có bổ sung chế phẩm vi sinh là 0,4% và 0,5% cho kết quả hàm lượng TAN, NO_2^- , NO_3^- , mật số vi khuẩn *Vibrio* có khả năng cải thiện môi trường nước trong bể nuôi tôm thẻ chân trắng, giúp tôm phát triển và tăng trưởng tốt, tỷ lệ sống cao hơn nghiệm thức đối chứng.

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* T₉ 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* T₉ 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 dạng 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 MgSO₄; (3) Mật độ vi khuẩn *R.rhodochrous* T₉ 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: (1) *B. licheniformis* B85: chất mang là bã đậu nành, tỷ lệ giống 5%, độ ẩm 55% và thời gian lên men là 60 giờ; (2) *P. stutzeri* KL15: chất mang là cám bắp, tỷ lệ giống 7,5%, độ ẩm 55% và thời gian lên men là 72 giờ; (3) *R.rhodochrous* T₉ : chất mang là 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 *B. licheniformis* B85, *P.stutzeri* KL15, *R. rhodochrous* T₉ có khả năng chuyển hóa ammonia, nitrite trong môi trường nước ương ấu trùng tôm thẻ chân trắng (post 5) ở mật độ 10^8 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 *B. licheniformis* B85, *P.stutzeri* KL15, *R. rhodochrous* T₉ 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 *B. licheniformis* B85, *P.stutzeri* KL15, *R. rhodochrous* T₉ 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 *B. licheniformis* B85, *P.stutzeri* KL15, *R. rhodochrous* T₉ với các sản phẩm xử lý môi trường nuôi tôm nước lợ trên thị trường.

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).