

PHÂN LẬP ĐỊNH DANH VI KHUẨN DỊ DƯỠNG CÓ KHẢ NĂNG SẢN SINH EXOPOLYSACCHARIDE VÀ LOẠI BỎ AMMONIA TỪ NƯỚC AO NUÔI TÔM XỬ LÝ CÔNG NGHỆ BIOFLOC

PHAN CÔNG HOÀNG, HOÀNG TÙNG

*Trưởng Đại học Quốc tế,
Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh*

Nghề nuôi tôm của Việt Nam đã có những bước phát triển mạnh mẽ trong những năm gần đây, đóng góp tích cực vào tổng kim ngạch xuất khẩu trên 2,0 tỉ đô la Mỹ hàng năm của ngành thủy sản. Mặc dù vậy từ cuối năm 2010, tình hình dịch bệnh trên tôm nuôi đã vượt ngoài tầm kiểm soát, gây thiệt hại nghiêm trọng cho người nuôi tôm và các doanh nghiệp. Bệnh tôm phổ biến nhất là hội chứng teo gan tụy cấp tính (AHPNS-Acute Hepatopancreas Necrosis Syndrome) và bệnh đốm trắng (White Spot Diseases) (Lightner và cs., 2012). Theo ước tính của Cục Thú y, mức thiệt hại là 1,65 và 1,05 tỉ đô la Mỹ cho 2 năm 2011 và 2012. Để ngăn chặn dịch bệnh, các mô hình nuôi ít thay nước được áp dụng. Tuy nhiên, thách thức lớn nhất cho các mô hình này là khả năng xử lý chất thải hữu cơ và các loại khí độc, trong đó có ammonia.

Công nghệ biofloc được xem là một trong những giải pháp hữu hiệu, giúp giải quyết khó khăn nêu trên (Taw và cs., 2008; Avnimelech, 2009). Công nghệ tạo điều kiện để vi khuẩn dị dưỡng trong ao nuôi tôm phát triển thông qua việc điều chỉnh tỷ lệ C/N trong nước ao. Trong các ao nuôi tôm thương phẩm, hàm lượng N thường cao hơn nhiều so với C do chất thải của tôm nuôi và thức ăn thừa đều giàu N. Vì thế, khi carbon hữu cơ được bổ sung vào nước ao và duy trì ở một tỷ lệ thích hợp, vi khuẩn dị dưỡng sẽ có điều kiện phát triển, lắng đáy. Vi khuẩn dị dưỡng sử dụng trực tiếp chất thải hữu cơ và ammonia để chuyển thành sinh khối vi khuẩn, nhờ vậy giúp làm sạch môi trường trong thời gian ngắn (Avnimelech và cs., 2009). Ở mật độ cao, các vi khuẩn này kết dính với nhau tạo hạt floc nhờ các hợp chất cao phân tử ngoại bào (Extracellular Polymeric Substances-EPS). Các hạt này có giá trị dinh dưỡng cao và được coi là nguồn thức ăn bổ sung tốt cho tôm nuôi, giúp giảm chi phí sản xuất (Crab và cs., 2012).

Khả năng tạo floc phụ thuộc nhiều vào khu hệ vi sinh vật tại địa phương. Vì thế việc xác định các chủng vi khuẩn có khả năng tạo floc, đánh giá năng suất EPS, khả năng xử lý ammonia và giá trị dinh dưỡng của chúng là hết sức cần thiết. Kết quả thu được sẽ là tiền đề quan trọng cho các bước sản xuất tiếp theo nhằm chủ động thúc đẩy sự hình thành của floc trong các ao nuôi tôm thâm canh.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu nước sử dụng cho nghiên cứu được thu từ 04 ao nuôi thương phẩm tôm thẻ chân trắng *Penaeus vannamei* tại Xuyên Mộc, tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu (10°36'33.83"N -107°26'03.62"E). Thời điểm thu mẫu vào tháng thứ 2 của vụ nuôi. Tổng cộng có 16 mẫu nước được thu, trộn lẫn để sử dụng cho thí nghiệm.

Để tạo floc, cho 15 lít nước thu từ ao nuôi tôm vào bình nhựa thể tích 20 lít. Hàm lượng nitơ tổng số (TAN) được ước lượng bằng bộ kit của C.P. Co. Ltd. Dựa vào hàm lượng TAN, bổ sung lượng carbon đạt tỷ lệ C/N là 20 (Avnimelech, 1999). Thí nghiệm gồm 03 nghiệm thức khác nhau về nguồn cơ chất carbon là mật rỉ đường (29,5% C, 0,6% N), đường ăn (sucrose 41,2% C, N không đáng kể) và bột mì (38,9% C, 1,8% N). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 03 lần.

Các thông số môi trường như độ pH, nhiệt độ, độ mặn, độ kiềm và tổng chất rắn hòa tan (Total Dissolved Solid-TDS) được xác định tại thời điểm trước và sau khi bổ sung cơ chất carbon, sau 6 giờ và sau 24 giờ. Các bình thí nghiệm được sục khí liên tục, đảm bảo duy trì hàm lượng oxy hòa tan > 4 ppm (Avnimelech, 2009). Thể tích floc (Floc Volume-FV) được xác định bằng phễu lắng Imhoff. Khi floc đã hình thành, chúng tôi tiến hành thu mẫu để sử dụng cho bước phân lập kế tiếp.

Mẫu floc được pha loãng để trải trên môi trường Zobell's Marine Agar (Himedia) và ủ ở 30°C trong 5 ngày. Các khuẩn lạc rời với hình thái khác nhau được đếm mật độ và cấy thuần trên môi trường TSA (Tryptone Soy Agar-Himedia). Các chủng này được nuôi tăng sinh, giữ giống trong 20% glycerol ở -80°C cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Để sàng lọc loại bỏ *Vibrio* spp., các chủng vi khuẩn được nhuộm gram, kiểm tra các thử nghiệm sinh hóa như oxidase, catalase, tan huyết và nuôi cấy trên môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt sucrose agar-Himedia). Chủng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường TCBS, gram âm, catalase và oxidase dương tính, kết hợp với khả năng tan huyết khi nuôi cấy trên môi trường thạch máu (Sheep Blood Agar-BA) được xác định thuộc nhóm vi khuẩn *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh trên các loài thủy sản.

Phương pháp kết tủa bằng ethanol (Zheng và cs., 2008) được sử dụng để xác định lượng EPS sản sinh ra bởi vi khuẩn. EPS có thành phần chủ yếu là các polysaccharide (Tsuneda và cs., 2003). Ethanol phá vỡ quá trình hydrate hóa của các polysaccharide và các ion tích điện trong nước. Điều này cho phép các phân tử polysaccharide đến gần nhau hơn, tương tác và tạo thành khối ổn định và có thể thu được bằng cách ly tâm. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng sucrose, 20g/L; cao nấm men 2,5g/L; KH₂PO₄ 2g/L; K₂HPO₄ 5g/L và NaCl 0,1g/L nước cất, pH 7 ở 30°C trong máy ủ lắc 150 rpm, 48 giờ. Ethanol lạnh được cho vào dịch vi khuẩn sau ly tâm (10.000rpm, 4°C, 20 phút) với tỷ lệ 3: 1 (V/V) và giữ lạnh ở 4°C trong vòng 24 giờ. Lượng EPS kết tủa được thu bằng cách ly tâm ở 10.000rpm, 4°C trong 15 phút và sấy ở 60°C đến khối lượng không đổi. Trọng lượng khô của EPS thô được xác định bằng cân phân tích. Các chủng vi khuẩn với khả năng sản sinh EPS cao được định danh bằng chỉ thị phân tử DNA gen 16S rRNA (Desouky và cs., 2008; Zheng và cs., 2008).

Để đánh giá khả năng xử lý ammonia, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy mẻ qua đêm ở 30°C, 150rpm trong môi trường lỏng có thành phần gồm: 20g sucrose; 8,2g KH₂PO₄; 0,5g MgSO₄.7H₂O; 2g NaOH; 0,5mg mỗi loại muối CaCl₂.2H₂O, ZnSO₄.H₂O, FeCl₃.6H₂O, CuSO₄.5H₂O; 15g NaCl trong 1 lít nước cất, pH 7.0. NH₄Cl được bổ sung vào môi trường với nồng độ 2mg NH₄-N/L tại thời điểm 0 giờ. 25ml mẫu được thu tại các thời điểm 0; 3 và 6 giờ để xác định nồng độ TAN bằng phương pháp Phenate tại bước sóng 640nm (Greenberg và cs., 1992).

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA) ở mức ý nghĩa 0,05 bằng phần mềm SPSS 16.0.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

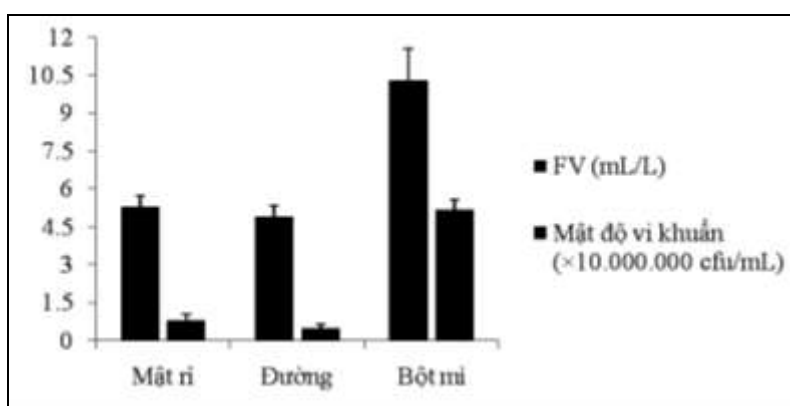
1. Tạo floc và phân lập vi khuẩn

Với mục tiêu thu thập tối đa các chủng vi khuẩn tồn tại trong mẫu biofloc, ba nguồn carbon khác nhau được sử dụng để cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn dị dưỡng phát triển. Kết quả cho thấy, với tỷ lệ C/N ở mức 20/1 và các thông số môi trường được duy trì ở điều kiện thích hợp (bảng 1), biofloc được hình thành trong tất cả các thí nghiệm với mật độ vi khuẩn tương đương 10⁶ cfu/ml trong mẫu bổ sung mật rỉ đường và đường sucrose, 10⁷ cfu/ml trong mẫu bổ sung bột mì. Thí nghiệm sử dụng nguồn cơ chất carbon là bột mì đạt FV cao nhất sau 24 giờ (P < 0,05). Qua phân lập và nuôi cấy thuần, chúng tôi xác định được tổng cộng 13 chủng vi khuẩn. Trong số này có 3 chủng thuộc nhóm *Vibrio* và đã được loại bỏ.

Bảng 1

Điều kiện môi trường của các nghiệm thức

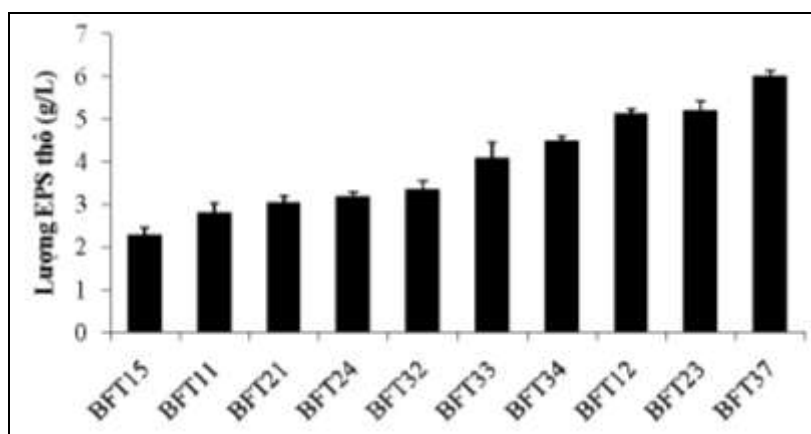
Thông số	Nghiệm thức	Mật ri đường	Đường	Bột mì
pH		8,0±0,1	8,2±0,1	7,9±0,1
Nhiệt độ (°C)		27,8±0,9	27,8±1,0	28,2±0,5
Oxy hòa tan (ppm)		6,4±0,4	6,7±0,3	6,0±0,4
Độ kiềm (ppm)		131,7±9,8	128,3±7,5	135,0±5,5
Độ mặn (ppt)		2,7±0,1	2,7±0,1	2,8±0,1
Tổng chất rắn hòa tan (TDS,mg/L)		3279,3±104,9	3229,4±122,4	3366,5±76,3
Hàm lượng TAN ban đầu (ppm)		2,0±0,1	2,0±0,2	1,0±0,4
Lượng C bổ sung (g/10 L)		2,30±0,02	0,95±0,01	6,91±0,01



Hình 1. Thể tích floc và mật độ vi khuẩn của 3 nghiệm thức mật ri đường, đường sucrose và bột mì tại thời điểm 24 giờ

2. So sánh khả năng sản sinh EPS

Kết quả cho thấy, trong cùng điều kiện nuôi tăng sinh mật độ cao, tất các chủng phân lập được đều có thể sản sinh EPS. Trong số này, khả năng sản sinh EPS của 3 chủng vi khuẩn (ký hiệu BFT12, BFT23 và BFT37) cao hơn so với các chủng còn lại ($P < 0,05$) (hình 2).

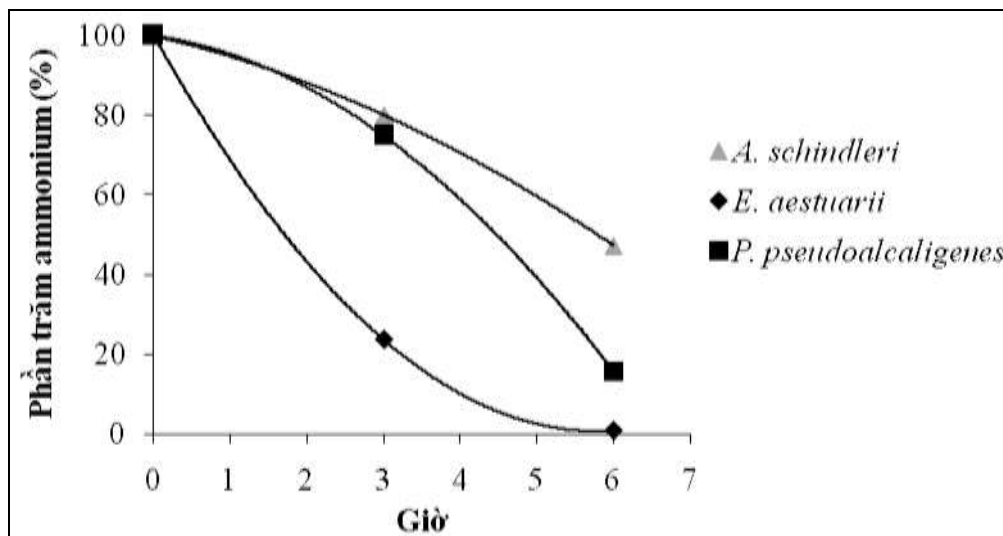


Hình 2. Năng suất EPS thô của các chủng vi khuẩn trong 48 giờ

3 chủng có lượng EPS thô > 5g/L được định danh bằng chỉ thị phân tử. Trình tự sau khi được so sánh với Genbank cho kết quả trùng khớp với các chủng *Acinetobacter schindleri*, *Exiguobacterium aestuarii* và *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Các chủng vi khuẩn tiết nhiều các EPS được xem là đóng vai trò quan trọng trong việc vận hành hệ thống biofloc (Urbain và cs., 1993; Avnimelech, 2009). Đã có nghiên cứu trước đây cho biết *P. pseudoalcaligenes* được coi là probiotic để quản lý môi trường nuôi thủy sản (Chaudhary và cs., 2008). Ngoài ra, còn một số kết luận về khả năng sử dụng chủng *A. schindleri* và *E. aestuarii* cho các quá trình làm sạch bằng phương pháp sinh học (Chabalala và cs., 2010; Kim và cs., 2005). Nhìn chung, thông tin về vai trò của 3 chủng vi khuẩn này còn rất hạn chế.

3. So sánh khả năng loại bỏ ammonia

Kết quả cho thấy có sự khác biệt giữa 3 chủng được kiểm tra ($P < 0,05$) về khả năng loại bỏ ammonia. Với mật độ vi khuẩn vào xấp xỉ 10^6 và tăng lên 10^7 sau 6 giờ, từ 0,2mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ tại thời điểm 0 giờ, *E. aestuarii* đã loại bỏ được trên 76,3% lượng TAN trong môi trường tại thời điểm 3 giờ và gần như hoàn toàn (99,2%) tại thời điểm 6 giờ. Tốc độ loại bỏ ammonia trong điều kiện của thí nghiệm của chủng này cao hơn so với 2 chủng còn lại ($P < 0,05$). Kết quả này cho thấy ở mật độ thích hợp và đủ lượng carbon bổ sung, vi khuẩn dị dưỡng sẽ sử dụng $\text{NH}_4\text{-N}$ để phát triển và chuyển hóa thành sinh khối, phù hợp với cơ chế sinh trưởng và phát triển của chúng (Avnimelech, 1999, 2009).



Hình 3. Phần trăm ammonia được loại bỏ bởi các chủng vi khuẩn

III. KẾT LUẬN

Có thể sử dụng cả 3 loại cơ chất (mật ri đường, đường sucrose và bột mì) để tạo floc ở tỷ lệ C/N là 20/1.

Các chủng có khả năng tạo EPS với năng suất trên 5g/L là *Acinetobacter schindleri*, *Exiguobacterium aestuarii* và *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Trong số này, khả năng xử lý ammonia của *E. aestuarii* là cao nhất, tương ứng với mức 99,2%/6 giờ.

Cần có nghiên cứu tiếp theo về giá trị dinh dưỡng và khả năng nuôi tăng sinh của các chủng đã phân lập được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Avnimelech Y., 1999. *Aquaculture*, 176: 227-235.
2. Avnimelech Y., 2009. *Biofloc Technology-A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
3. Crab R., Defoirdt T., Bossier P., Verstraete W., 2012. Bioflocs technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*.
4. Desouky A.m., Abd-El-Haleem, Roda F. Al-thani, Thourya Al-mokemy, 2008. *Polish Journal of Microbiology*, 57: 231-239.
5. Greenberg A. E., Clesceri L. S., Eaton A. D., 1992. Standard methods for the examination of waste and wastewater. *American Public Health Society*.
6. Lightner D. V., Redman R.m., Pantoja C. R., Noble B. I., Tran L., 2012. *Global Aquaculture Advocate Magazine*, 40.
7. Taw N., Fuat H., Tarigan N., Sidabutar K., 2008. *Global Aquaculture Advocate*, p. 84-86.
8. Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A., 2003. *FEMS Microbiolog*, 223 (2): 287-292.
9. Urbain V., Block J. C., Manem J., 1993. *Water Res.*, 27: 829-838.
10. Zheng Y., Ye Z. L., Fang X. L., Li Y. H., Cai W.m., 2008. *Bioresource Technology*, 99: 7686-7691.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF HETEROTROPHIC BACTERIA CAPABLE OF PRODUCING EXOPOLYSACCHARIDE AND REMOVING AMMONIA FROM SHRIMP POND WATER APPLYING BIOFLOC TECHNOLOGY

PHAN CONG HOANG, HOANG TUNG

SUMMARY

Biofloc technology is considered as a viable solution for waste treatment, food supplement and disease control in intensive aquaculture systems. The addition of carbon to maintain the ratio of C/N in the water will create conditions for the development of heterotrophic bacteria and the production of extracellular polymeric substances (EPS) for floc formation. This study was to isolate and identify bacterial strains capable of producing floc from shrimp pond water and assess the production of extracellular polymeric substances (EPS), as well as their ammonia handling. Molasses, sucrose and wheat flour were used as carbon sources added to *Penaeus vannamei*'s pond water. Biofloc samples were collected and cultured by conventional methods and screened to eliminate pathogenic *Vibrio* spp. As a result, three bacterial strains have been isolated (*Acinetobacter schindleri*, *Exiguobacterium aestuarii* and *Pseudomonas pseudoalcaligenes*) with the ability of forming floc through high EPS production ($> 5\text{g/L}$, $p < 0.05$). Ability to handle $\text{NH}_4\text{-N}$ of *E. aestuarii* was highest ($p < 0.05$), achieved 99.2% after 6 hours. This study provides initial important information to develop probiotics for intensive shrimp farming applying Biofloc technology.