

GS. TS VŨ NGỌC ỨT (Chủ biên)
PGS. TS PHẠM THỊ TUYẾT NGÂN
TS HUỲNH TRƯỜNG GIANG
TS NGUYỄN THỊ KIM LIÊN - TS TRẦN VĂN VIỆT

QUI TRÌNH KỸ THUẬT

**QUAN TRẮC VÀ PHÁT TRIỂN CÁC DÒNG VI KHUẨN CÓ LỢI
CHO QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG NƯỚC
TRONG NUÔI THỦY SẢN**



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

QUI TRÌNH KỸ THUẬT

QUAN TRẮC VÀ PHÁT TRIỂN
CÁC DÒNG VI KHUẨN CÓ LỢI
CHO QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG
NƯỚC TRONG NUÔI THỦY SẢN

GS. GTS VŨ NGỌC ÚT (Chủ biên)

TS HUỖNH TRƯỜNG GIANG – PGS. TS PHẠM THỊ TUYẾT NGÂN

TS NGUYỄN THỊ KIM LIÊN - TS TRẦN VĂN VIỆT

QUI TRÌNH KỸ THUẬT

**QUAN TRẮC VÀ PHÁT TRIỂN CÁC DÒNG VI KHUẨN CÓ LỢI
CHO QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG NƯỚC TRONG NUÔI THỦY SẢN**



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

LỜI GIỚI THIỆU

Với xu thế thâm canh hóa trong nông nghiệp và thủy sản, cùng với quá trình đô thị hóa và công nghiệp hóa, lượng chất thải thải ra môi trường ngày càng nhiều, gây ra các tác động đáng kể đến chất lượng nguồn nước mặt ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Nuôi trồng thủy sản hiện nay, nhất là nuôi tôm biển đã và đang chịu áp lực lớn về vấn đề môi trường, một mặt ô nhiễm nội tại (nguồn chất hữu cơ hình thành bên trong hệ thống nuôi do thâm canh hóa), một mặt từ nguồn nước bên ngoài (từ nhiều nguồn ô nhiễm khác nhau). Sự suy thoái, ô nhiễm môi trường nước đã và đang gia tăng dịch bệnh đáng kể trong nuôi thủy sản ảnh hưởng đến năng suất, sản lượng và tính bền vững của nghề nuôi thủy sản.

Nhiều giải pháp đã và đang được người dân sử dụng để giảm thiểu ô nhiễm, hạn chế sự bùng phát dịch bệnh trong các mô hình nuôi thủy sản như áp dụng mô hình nuôi ít thay nước, công nghệ biofloc, sử dụng chế phẩm sinh học, men vi sinh... Các chế phẩm sinh học bao gồm men vi sinh đã hỗ trợ chuyên hóa, giảm thiểu lượng chất hữu cơ trong ao giúp giảm thiểu ô nhiễm và khả năng bùng phát dịch bệnh.

Tuy nhiên, việc theo dõi chất lượng nguồn nước bên ngoài hệ thống nuôi cũng là một trong những yếu tố quan trọng giúp giảm thiểu rủi ro khi đưa nguồn nước với chất ô nhiễm và mầm bệnh vào trong hệ thống. Chính vì vậy, việc kết hợp giữa quan trắc chất lượng nước bên ngoài với quản lý chất lượng nước bên trong bằng việc sử dụng vi sinh vật hữu ích là một trong những giải pháp cần áp dụng cho những khu vực nuôi thủy sản thâm canh hiện nay để giảm thiểu ô nhiễm hai chiều, góp phần tăng tính bền vững của ngành thủy sản.

Phương pháp quan trắc chất lượng nước truyền thống trong các thủy vực tự nhiên (sông, kênh, rạch) được thực hiện chủ yếu là phương pháp quan trắc hóa học thông qua việc đo đạc các thông số môi trường nước như oxy hòa tan (DO), tiêu hao oxy sinh học (BOD), tiêu hao oxy hóa học (COD), hàm lượng đạm, lân, chất rắn lơ lửng (TSS)... Nếu kết quả đo đạc các yếu tố này được bản đồ hóa, sẽ giúp người theo dõi, quản lý

chất lượng nước thấy được tổng thể sự biến động các yếu tố này theo không gian và thời gian, từ đó có những biện pháp xử lý phù hợp. Tuy nhiên phương pháp quan trắc hóa học thường cho kết quả có tính tức thời, nhất là trong các hệ thống thủy vực nước chảy do tác động của dòng chảy. Để có được kết quả đáng tin cậy và chính xác hơn nên kết hợp phương pháp quan trắc hóa học với phương pháp quan trắc sinh học (dựa vào các nhóm sinh vật chỉ thị).

Sau hơn 2 năm, chương trình nghiên cứu Quan trắc và quản lý môi trường trong thủy sản (ký hiệu là F5) do GS. TS Vũ Ngọc Út chủ trì, trong khuôn khổ Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ (VN14-P6) bằng vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản đã đạt được những kết quả đáng kể về lĩnh vực quan trắc sinh học môi trường nước dựa vào các nhóm sinh vật chỉ thị như động vật không xương sống cỡ lớn (ĐVKXSCL), phiêu sinh động vật, bản đồ hóa, mô hình hóa trong quản lý chất lượng nước. Và nhất là phân lập, sàng lọc các chủng vi khuẩn có lợi như vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh (H_2S , HS^- và S^{2-}), vi khuẩn chuyển hóa đạm (NH_3/NH_4^+ , NO_2^-), và các dòng vi khuẩn *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces* (xạ khuẩn)... để ứng dụng trong quản lý chất lượng nước cũng như tăng khả năng đề kháng, tăng trưởng của tôm, cá nuôi trong các hệ thống nuôi thâm canh.

Các kết quả của chương trình ODA cùng với kết quả từ những nghiên cứu liên quan do đội ngũ tác giả thực hiện trong những năm vừa qua tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ đã được hệ thống hóa và phát triển các qui trình kỹ thuật và tổng hợp thành quyển sách này. Các qui trình kỹ thuật được trình bày trong sách bao gồm:

- (i) Quan trắc sinh học môi trường nước dựa trên động vật không xương sống cỡ lớn;
- (ii) Quan trắc sinh học môi trường nước dựa trên phiêu sinh động vật;
- (iii) Sử dụng kỹ thuật GIS trong bản đồ hóa chất lượng nước;
- (iv) Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm trong bùn đáy ao cho xử lý nước nuôi trồng thủy sản;
- (v) Phân lập và tuyển chọn lợi khuẩn *Bacillus* sp. cho xử lý nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*;

- (vi) Tuyển chọn vi khuẩn *Lactobacillus* sp. và phát triển sản phẩm probiotic cho tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*;
- (vii) Phân lập một số xạ khuẩn tiềm năng ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản;
- (viii) Phân lập, sàng lọc và đánh giá hiệu quả của vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh phục vụ nuôi trồng thủy sản;
- (ix) Sàng lọc các hỗn hợp ly trích từ sản phẩm tự nhiên có hoạt tính prebiotic để phát triển synbiotic cho tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*.

Trong mỗi qui trình, 2 nội dung chính được trình bày bao gồm: Qui trình kỹ thuật (mô tả các bước thực hiện qui trình) và Kết quả thực nghiệm qui trình (minh họa kết quả nghiên cứu thực nghiệm làm cơ sở phát triển qui trình). Các qui trình được trình bày chi tiết, hướng tới đối tượng có thể sử dụng hay tham khảo là cán bộ địa phương trong lĩnh vực thủy sản hay quan trắc, quản lý môi trường; người nuôi thủy sản, nhất là nuôi thâm canh; cán bộ nghiên cứu, giảng viên, sinh viên, học viên.

Do lần đầu được xuất bản nên không thể tránh khỏi những thiếu sót về hình thức cũng như nội dung, nhóm tác giả xin chân thành biết ơn những góp ý quý báu từ quý độc giả để nội dung của quyển sách ngày càng hoàn thiện hơn ở các lần tái bản tiếp theo.

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ (VN14-P6) bằng vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện các nghiên cứu; chân thành cảm ơn các thầy cô, đồng nghiệp, các em học viên, sinh viên Khoa Thủy sản, lãnh đạo và cán bộ các Chi cục Thủy sản các tỉnh An Giang, Sóc Trăng, Bạc Liêu, Cà Mau và thành phố Cần Thơ, Công ty TNHH MTV UV, Công ty TNHH TM XNK Mỹ Bình đã có nhiều hỗ trợ, đóng góp cho việc hoàn thành Chương trình nghiên cứu này.

Chủ biên

GS. TS Vũ Ngọc Út

TÁC GIẢ THAM GIA BIÊN SOẠN

Qui trình 1: Quan trắc sinh học môi trường nước dựa trên động vật không xương sống cỡ lớn

Nguyễn Thị Kim Liên, Vũ Ngọc Út, Huỳnh Trường Giang và Âu Văn Hóa

Qui trình 2: Quan trắc sinh học môi trường nước dựa trên phiêu sinh động vật

Nguyễn Thị Kim Liên, Vũ Ngọc Út, Huỳnh Trường Giang và Âu Văn Hóa

Qui trình 3: Sử dụng kỹ thuật GIS trong bản đồ hóa chất lượng nước...

Trần Văn Việt, Vũ Ngọc Út, Huỳnh Trường Giang, Âu Văn Hóa và Trần Trung Giang

Qui trình 4: Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm trong bùn đáy ao cho xử lý nước nuôi trồng thủy sản

Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Ngọc Út, Vũ Hùng Hải, Huỳnh Thị Ngọc Hiền và Huỳnh Trường Giang

Qui trình 5: Phân lập và tuyển chọn lợi khuẩn *Bacillus* sp. cho xử lý nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*

Phạm Thị Tuyết Ngân, Huỳnh Trường Giang và Vũ Hùng Hải

Qui trình 6: Tuyển chọn vi khuẩn *Lactobacillus* sp. và phát triển sản phẩm probiotic cho tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*.....

Huỳnh Trường Giang, Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải và Phan Thị Cẩm Tú

Qui trình 7: Phân lập và tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn tiềm năng ứng dụng trong nuôi trồng

Phạm Thị Tuyết Ngân, Huỳnh Trường Giang và Vũ Hùng Hải

Qui trình 8: Phân lập, sàng lọc và đánh giá hiệu quả của vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh phục vụ nuôi trồng thủy sản

Huỳnh Trường Giang, Phạm Thị Tuyết Ngân và Vũ Hùng Hải

Qui trình 9: Sàng lọc các hỗn hợp ly trích từ sản phẩm tự nhiên có hoạt tính prebiotic để phát triển synbiotic cho tằm thể chân trắng *Litopenaeus vannamei*.....

Huỳnh Trường Giang, Phạm Thị Tuyết Ngân và Vũ Hùng Hải

MỤC LỤC

Lời giới thiệu	5
Tác giả tham gia biên soạn	8
Mục lục	10
Danh mục bảng	20
Danh mục hình	22

QUI TRÌNH 1

QUAN TRẮC SINH HỌC MÔI TRƯỜNG NƯỚC DỰA TRÊN ĐỘNG VẬT KHÔNG XƯƠNG SỐNG CỠ LỚN

1.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	25
1.1.1. Sơ lược về động vật không xương sống cỡ lớn	26
1.1.2. Cơ sở khoa học phát triển qui trình	27
1.1.3. Ưu điểm và nhược điểm của qui trình	27
1.1.3.1. Ưu điểm.....	27
1.1.3.2. Nhược điểm.....	27
1.1.4. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất	28
1.1.5. Chọn điểm thu mẫu.....	28
1.1.6. Chu kỳ thu mẫu.....	28
1.1.7. Phương pháp thu mẫu.....	29
1.1.8. Phương pháp phân tích mẫu.....	30
1.1.9. Phương pháp áp dụng các chỉ số sinh học để đánh giá hiện trạng chất lượng nước	31
1.1.9.1. Dựa vào hệ thống điểm BMWP ^{VIET} (Biological Monitoring Working Party)	31

1.1.9.2. Chỉ số trung bình trên bậc họ (Average Score Per Taxon, ASPT).....	35
1.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH.....	36
1.3. TÓM TẮT QUI TRÌNH.....	39
1.4. KẾT LUẬN.....	39

QUI TRÌNH 2

QUAN TRẮC SINH HỌC MÔI TRƯỜNG NƯỚC

DỰA TRÊN PHIÊU SINH ĐỘNG VẬT

2.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	40
2.1.1. Giới thiệu.....	40
2.1.2. Sơ lược về phiêu sinh động vật.....	41
2.1.3. Ưu điểm và nhược điểm của qui trình	41
2.1.3.1. Ưu điểm.....	41
2.1.3.2. Nhược điểm.....	42
2.1.4. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất.....	42
2.1.5. Chọn điểm thu mẫu.....	42
2.1.6. Chu kỳ thu mẫu.....	43
2.1.7. Thời gian thu mẫu.....	43
2.1.8. Phương pháp thu mẫu.....	43
2.1.8.1. Phương pháp thu mẫu định tính.....	43
2.1.8.2. Phương pháp thu mẫu định lượng.....	44
2.1.9. Phương pháp phân tích mẫu	45
2.1.9.1. Phân tích mẫu định tính.....	45
2.1.9.2. Phân tích mẫu định lượng	46

2.1.9.3. Các chỉ số sinh học sử dụng trong quan trắc sinh học.....	48
2.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH.....	49
2.2.1. Địa điểm nghiên cứu.....	49
2.2.2. Thành phần phiêu sinh động vật trên sông Hậu.....	51
2.2.2.1. Tổng số loài phiêu sinh động vật trên sông Hậu	51
2.2.2.2. Thành phần phiêu sinh động vật trên sông chính, sông nhánh và tại các vị trí thu mẫu trên sông Hậu	52
2.2.3. Mật độ phiêu sinh động vật trên sông Hậu	54
2.2.4. Đánh giá chất lượng nước trên sông Hậu sử dụng phiêu sinh động vật.....	56
2.2.5. Kết luận nghiên cứu điển hình	59
2.3. TÓM TẮT QUI TRÌNH.....	59
2.4. KẾT LUẬN.....	60

QUI TRÌNH 3

SỬ DỤNG KỸ THUẬT GIS TRONG BẢN ĐỒ HÓA CHẤT LƯỢNG NƯỚC

3.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	61
3.1.1. Giới thiệu.....	61
3.1.2. Cơ sở khoa học phát triển qui trình	61
3.1.2.1. Sơ lược về GIS và bản đồ.....	62
3.1.2.2. Một số lý do làm cho GIS chưa phổ biến trong lĩnh vực thủy sản và môi trường.....	63
3.1.3. Quan trắc môi trường	64
3.1.3.1. Đối với chỉ tiêu đo trực tiếp	65
3.1.3.2. Đối với chỉ tiêu phân tích ở phòng thí nghiệm	65

3.1.4. Ưu điểm và nhược điểm của qui trình	67
3.1.4.1. Ưu điểm.....	67
3.1.4.2. Nhược điểm.....	67
3.1.5. Phương pháp sử dụng kỹ thuật GIS trong thiết lập bản đồ hóa chất lượng nước	68
3.1.5.1. Đưa hệ tọa độ vào Google Earth Pro	68
3.1.5.2. Số hóa vùng nghiên cứu từ bản đồ nền	70
3.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH	74
3.3. ỨNG DỤNG CỦA GIS.....	76
3.4. KẾT LUẬN.....	76

QUI TRÌNH 4

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN CHUYÊN HÓA ĐẠM TRONG Bùn ĐÁY AO CHO XỬ LÝ NƯỚC NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

4.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	77
4.1.1. Trang thiết bị cần thiết.....	77
4.1.2. Thu mẫu và xử lý mẫu.....	77
4.1.3. Phân lập và nuôi tăng sinh vi khuẩn trên môi trường thạch	78
4.1.3.1. Phương pháp xác định hình dạng, đặc điểm sinh lý, sinh hóa	78
4.1.3.2. Phương pháp sàng lọc trong phòng thí nghiệm	79
4.1.3.3. Đánh giá khả năng chuyên hóa đạm của các chủng vi khuẩn tuyển chọn	79
4.1.4. Phân lập và nuôi tăng sinh vi khuẩn trên môi trường lỏng	80
4.1.4.1. Môi trường phân lập	80

4.1.4.2. Môi trường nuôi sinh khối	80
4.1.4.3. Phương pháp phân lập	81
4.1.4.4. Phương pháp nuôi tăng sinh.....	81
4.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH	82
4.2.1. Đặc điểm khuẩn lạc	82
4.2.2. Đặc điểm tế bào vi khuẩn.....	83
4.2.3. Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn chuyển hóa	83
4.2.4. Khả năng oxy hóa ammonia của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.....	83
4.2.4.1. Biến động hàm lượng TAN.....	83
4.2.4.2. Biến động hàm lượng N-NO ₂ ⁻	84
4.2.5. Khả năng chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn chọn lọc.....	85
4.2.5.1. Biến động hàm lượng N-NO ₂ ⁻	85
4.2.5.2. Biến động hàm lượng N-NO ₃ ⁻	86
4.3. KẾT LUẬN.....	87

QUI TRÌNH 5

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN LỢI KHUẨN *Bacillus* sp. CHO XỬ LÝ NƯỚC AO NUÔI TÔM *Litopenaeus vannamei*

5.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	88
5.1.1. Thiết bị và hóa chất	88
5.1.2. Môi trường nuôi cấy	88
5.1.3. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn.....	89
5.1.3.1. Thu và xử lý mẫu	89

5.1.3.2. Phương pháp phân lập	89
5.1.3.3. Đặc điểm nhận dạng	89
5.1.3.4. Khả năng kháng <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	90
5.1.3.5. Hoạt tính enzyme ngoại bào.....	91
5.1.3.6. Đánh giá mức độ an toàn của chủng lợi khuẩn trên tôm thẻ chân trắng <i>Litopenaeus vannamei</i>	92
5.1.4. Ứng dụng lợi khuẩn <i>Bacillus</i> trong xử lý nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng <i>Litopenaeus vannamei</i>	92
5.1.5. Phương pháp phân tích.....	94
5.1.5.1. Chỉ tiêu vi khuẩn.....	94
5.1.5.2. Môi trường chất lượng nước	95
5.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH.....	95
5.2.1. Phân lập và đặc điểm sinh hóa.....	95
5.2.2. Sàng lọc khả năng đối kháng <i>V. parahaemolyticus</i>	96
5.2.3. Phương pháp đồng nuôi cấy.....	97
5.2.4. Hoạt tính enzyme ngoại bào.....	97
5.2.5. Đánh giá độ an toàn sinh học	97
5.2.6. Ứng dụng <i>Bacillus</i> CM3.1 trong xử lý nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng <i>Litopenaeus vannamei</i>	98
5.3. KẾT LUẬN.....	99

QUI TRÌNH 6

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Lactobacillus* sp. VÀ PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM PROBIOTIC CHO TÔM THẺ CHÂN TRẮNG *Litopenaeus vannamei*

6.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	100
-------------------------------	-----

6.1.1. Trang thiết bị và hóa chất.....	100
6.1.2. Môi trường nuôi cấy	100
6.1.3. Thu và xử lý mẫu	100
6.1.4. Phân lập và nhận diện vi khuẩn <i>Lactobacillus</i> spp.....	100
6.1.5. Đánh giá khả năng kháng khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	101
6.1.6. Đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào của vi khuẩn <i>Lactobacillus</i> chọn lọc	101
6.1.7. Độ an toàn và sự phát triển vi khuẩn lactic (LAB) trong ruột tôm sau khi cho ăn.....	102
6.1.8. Sàng lọc cơ chất phát triển probiotic dạng bột.....	103
6.1.8.1. Chuẩn bị tế bào lợi khuẩn	103
6.1.8.2. Xử lý và phát triển sản phẩm probiotic dạng bột.....	103
6.1.9. Phương pháp phân tích	103
6.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH.....	105
6.2.1. Phân lập và nhận dạng giống <i>Lactobacillus</i> trong ruột tôm thẻ chân trắng	105
6.2.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn <i>V.parahaemolyticus</i>	106
6.2.3. Hoạt tính enzyme của <i>Lactobacillus</i> chọn lọc	106
6.2.4. Độ an toàn và mật độ của chủng vi khuẩn chọn lọc trên tôm thẻ chân trắng	107
6.2.5. Phát triển probiotic dạng bột.....	107
6.2.5.1. Mật độ LAB trong sản phẩm.....	107
6.2.5.2. Hằng số tế bào chết tuyệt đối	108
6.2.5.3. Hoạt tính enzyme ngoại bào.....	108
6.3. KẾT LUẬN.....	110

QUI TRÌNH 7
PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN
MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN TIỀM NĂNG
ỨNG DỤNG TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

7.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	111
7.1.1. Thiết bị và hóa chất	111
7.1.2. Môi trường nuôi cấy	111
7.1.3. Thu mẫu và xử lý mẫu.....	111
7.1.4. Phân lập và định danh	112
7.1.5. Sàng lọc các chủng có hoạt tính kháng khuẩn	112
7.1.6. Đánh giá hoạt tính Enzym ngoại bào	113
7.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH.....	114
7.2.1. Phân lập và đặc điểm nhận dạng.....	114
7.2.2. Khả năng kháng vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	115
7.2.3. Hoạt tính Enzym ngoại bào.....	115
7.3. KẾT LUẬN.....	116

QUI TRÌNH 8
PHÂN LẬP, SÀNG LỌC VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ
CỦA VI KHUẨN CHUYỂN HÓA LƯU HUỖNH
PHỤC VỤ NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

8.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	117
8.1.1. Trang thiết bị và hóa chất.....	117
8.1.2. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy	117
8.1.3. Thu mẫu và xử lý mẫu.....	117

8.1.4. Tăng sinh và phân lập.....	118
8.1.5. Định danh vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh	119
8.1.5.1. Phân lập vi khuẩn.....	119
8.1.5.2. Đặc điểm hình thái tế bào.....	119
8.1.5.3. Đặc điểm sinh hóa	120
8.1.6. Đánh giá khả năng hình thành SO_4^{2-}	121
8.1.7. Đánh giá hoạt tính enzyme oxy hóa S^{2-}	122
8.1.8. Khả năng xử lý S^{2-} trong nước ao nuôi	122
8.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH.....	122
8.2.1. Thu mẫu và phân lập	122
8.2.2. Kết quả đánh giá khả năng hình thành SO_4^{2-}	123
8.2.3. Đánh giá hoạt tính enzyme oxy hóa sulfide	124
8.3. KẾT LUẬN.....	124

QUI TRÌNH 9

SÀNG LỌC CÁC HỖN HỢP LY TRÍCH TỪ SẢN PHẨM TỰ NHIÊN CÓ HOẠT TÍNH PREBIOTIC ĐỂ PHÁT TRIỂN SYNBIOITIC CHO TÔM *Litopenaeus vannamei*

9.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT	126
9.1.1. Thiết bị và hóa chất	126
9.1.2. Môi trường nuôi cấy	126
9.1.3. Chuẩn bị hỗn hợp dịch chiết prebiotic	126
9.1.4. Phương pháp đánh giá khả năng tiêu hóa các bột prebiotic của chủng probiotic <i>Lactobacillus</i> TV32	127
9.1.5. Đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng của lợi khuẩn <i>Lactobacillus</i> TV32 bởi prebiotic	129

9.1.6. Phương pháp đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng vi khuẩn gây bệnh bởi các prebiotic	129
9.1.7. Đánh giá chỉ số prebiotic.....	129
9.1.8. Phương pháp đánh giá hoạt tính protease tiết ra bởi lợi khuẩn nuôi trong môi trường bổ sung prebiotic	130
9.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH.....	130
9.2.1. Khả năng tiêu hóa prebiotic của chủng LAB TV32	130
9.2.2. Kích thích tăng trưởng của lợi khuẩn <i>Lactobacillus</i> TV32 bởi prebiotic.....	131
9.2.3. Kích thích tăng trưởng vi khuẩn gây bệnh bởi prebiotic và chỉ số prebiotic	131
9.2.4. Hoạt tính protease của lợi khuẩn nuôi trong môi chứa prebiotic..	133
9.3. KẾT LUẬN.....	133
TÀI LIỆU THAM KHẢO	134

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Chỉ số BMWP ^{VIET-HR} ứng dụng cho lưu vực sông Hậu	32
Bảng 1.2. Thang xếp loại chỉ số sinh học ASPT và mức độ ô nhiễm (Enviromental Agency, UK, 1997)	36
Bảng 1.3. Điểm BMWPVIET-HR, ASPT và đánh giá chất lượng nước tại các vị trí khảo sát	38
Bảng 2.1. Các chỉ số sinh học ứng dụng trong quan trắc sinh học sử dụng PSDV	48
Bảng 2.2. Phân mức chất lượng nước dựa vào chỉ số đa dạng Shannon-Weiner (H').....	49
Bảng 2.3. Đánh giá mức độ dinh dưỡng của thủy vực dựa vào mật độ PSDV	49
Bảng 2.4. Tọa độ các điểm thu mẫu trên sông Hậu	50
Bảng 2.5. Phân mức chất lượng nước tại các điểm thu mẫu trên sông Hậu	58
Bảng 3.1. Phương pháp thu, bảo quản và phân tích mẫu	66
Bảng 3.2. Chuyển đơn vị tọa độ sang dạng thập phân radian	68
Bảng 4.1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập	82
Bảng 4.2. Đặc điểm tế bào của các chủng phân lập.....	83
Bảng 4.3. Sự suy giảm hàm lượng TAN (mg/L) bởi vi khuẩn AOB....	84
Bảng 4.4. Hàm lượng N-NO ₂ ⁻ (mg/L) tạo thành bởi vi khuẩn AOB	84
Bảng 4.5. Sự suy giảm N-NO ₂ ⁻ (mg/L) bởi vi khuẩn NOB	85
Bảng 4.6. Hàm lượng N-NO ₃ ⁻ (mg/L) tạo thành bởi vi khuẩn NOB...	86
Bảng 5.1. Công thức nuôi sinh khối vi khuẩn thể tích lớn	93
Bảng 5.2. Hoạt tính enzyme của các chủng phân lập	97
Bảng 6.1. Hoạt tính enzyme ngoại bào của vi khuẩn	106

Bảng 6.2. Biến động mật độ vi khuẩn lactic LAB (CFU/g).....	107
Bảng 6.3. Hằng số tế bào chết tuyệt đối (k /ngày)	108
Bảng 6.4. Hoạt tính protease (U/mL)	109
Bảng 6.5. Hoạt tính α -amylase (U/mL)	109
Bảng 7.1. Đường kính vòng kháng khuẩn của các chủng phân lập....	115
Bảng 7.2. Hoạt tính enzyme của xạ khuẩn (U/mL)	116
Bảng 8.1. Một số đặc điểm của các giống vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh tham khảo.....	121
Bảng 8.2. Đặc điểm hình thái và sinh hóa các chủng vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh.....	123
Bảng 8.3. Hàm lượng sulfate (SO_4^{2-}) và pH sau 168 giờ	124
Bảng 8.4. Hoạt tính enzyme oxy hoá sulfide	124
Bảng 9.1. Thành phần môi trường MRS cải tiến (g/100 mL)	128

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cách thu mẫu động vật đáy: Mẫu được thu bằng gàu đáy (ảnh trái) và mẫu được lọc qua sàng 0,5 mm (ảnh phải)	29
Hình 1.2. Cách thu mẫu côn trùng thủy sinh. Sử dụng vợt cầm tay để thu mẫu (ảnh trái) và tìm bắt những ĐVKXSCL bám vào giá thể và cây cỏ thủy sinh (ảnh phải)	30
Hình 1.3. Thành phần họ ĐVKXSCL tại các điểm thu mẫu.....	36
Hình 1.4. Tóm tắt qui trình quan trắc sinh học sử dụng ĐVKXSCL ...	39
Hình 2.1. Cách thu mẫu định tính phiêu sinh động vật	44
Hình 2.2. Cách thu mẫu định lượng phiêu sinh động vật	45
Hình 2.3. Phương pháp đếm số lượng PSDV.....	47
Hình 2.4. Thành phần phiêu sinh động vật tại các vị trí thu mẫu trên sông Hậu	54
Hình 2.5. Biến động mật độ động vật nổi trên sông Hậu	56
Hình 2.6. Chỉ số đa dạng Shannon-Weiner (H').....	57
Hình 2.7. Chỉ số đồng đều Pielou (J).....	57
Hình 3.1. Tính liên tục của bản đồ raster và tính rời rạc của bản đồ vector..	63
Hình 3.2. Quan trắc tại hiện trường (a) và (b), thu mẫu về phân tích ở phòng thí nghiệm (c) và (d) Phương pháp phân tích mẫu ...	65
Hình 3.3. Truy vấn tìm giá trị theo nhu cầu người dùng.....	67
Hình 3.4. Đưa bản số liệu từ quan trắc trong đó có tọa độ đã chuyển và mã số điểm thu lên Google Earth	69
Hình 3.5. Xác định ranh giới các tỉnh (a), xác định diện tích nuôi tôm ven biển các tỉnh ĐBSCL 2020 (b)	70
Hình 3.6. Sơ đồ cách thực hiện tạo bản đồ.....	71
Hình 3.7. Cách tạo bản đồ chất lượng nước theo nhu cầu người dùng	72

Hình 3.8. Kết nối cơ sở dữ liệu lưu trên file excel với phần mềm.....	72
Hình 3.9. Bản đồ có thể trang trí bằng nhiều dạng khác nhau dạng điểm (a) hoặc dạng thanh đồ thị (b) theo nhu cầu người dùng.....	73
Hình 3.10. Tích hợp kết quả quan trắc lên bản đồ	73
Hình 3.11. Độ mặn ở mùa khô và mùa mưa	74
Hình 3.12. pH ở mùa khô và mùa mưa.....	74
Hình 3.13. BOD và COD ở mùa khô và mùa mưa	75
Hình 3.14. H ₂ S, Coliform và Ecoli ở mùa khô và mùa mưa.....	75
Hình 4.1. Dụng cụ thu mẫu bùn đáy ao nuôi tôm	77
Hình 4.2. Hình dạng khuẩn lạc (trái) và tế bào nhuộm Gram (phải) của vi khuẩn AOB TB7.2	87
Hình 4.3. Hình dạng khuẩn lạc (trái) và tế bào nhuộm Gram (phải) của vi khuẩn AOB TV4.2	87
Hình 5.1. Hệ thống nuôi sinh khối vi khuẩn	93
Hình 5.2. Ao thí nghiệm bổ sung lợi khuẩn <i>Bacillus</i> CM3.1	94
Hình 5.3. Hình thái khuẩn lạc (trái) và tế bào gram dương của vi khuẩn <i>Bacillus</i> CM3.1	96
Hình 5.4. Khả năng kháng <i>V. parahaemolyticus</i> bằng phương pháp cấy vệt vuông góc.....	96
Hình 5.5. Biến động mật độ <i>V. parahaemolyticus</i> khi đồng nuôi cấy với vi khuẩn <i>Bacillus</i> CM3.1	97
Hình 5.6. Mật độ <i>Bacillus</i> tổng số trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng ...	98
Hình 5.7. Biến động TAN (trái) và N-NO ₂ ⁻ (phải) trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng	99
Hình 6.1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn <i>Lactobacillus</i> sp. ..	105
Hình 6.2. Vòng kháng khuẩn với vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i>	106
Hình 6.3. Sản phẩm probiotic sau khi đóng gói	108

Hình 7.1. Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường SCA (trái) và tế bào nhuộm gram (phải) của xạ khuẩn.....	114
Hình 7.2. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn với <i>V. parahaemolyticus</i> bằng phương pháp cấy vệt vuông góc.....	115
Hình 8.1. Thu mẫu bùn đáy ao	118
Hình 8.2. Sự thay đổi màu của môi trường TSM thạch và lỏng	123
Hình 9.1. Khả năng sử dụng prebiotic bởi lợi khuẩn <i>Lactobacillus</i> TV32 sau 24 giờ	131
Hình 9.2. Sự tăng trưởng của LAB TV32 trong môi trường <i>m</i> -MRS với các prebiotic khác nhau.....	132
Hình 9.3. Sự tăng trưởng của <i>V. haverlyi</i> (trái) và <i>V. parahaemolyticus</i> (phải) trong môi trường <i>m</i> -MRS chứa prebiotic	132
Hình 9.4. Hoạt tính protease sinh ra bởi lợi khuẩn LAB TV32 trong môi trường chứa glucose và prebiotic.....	133

QUI TRÌNH 1

QUAN TRẮC SINH HỌC MÔI TRƯỜNG NƯỚC DỰA TRÊN ĐỘNG VẬT KHÔNG XƯƠNG SỐNG CỖ LỚN

1.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

Hiện nay, chất lượng nước được quan trắc chủ yếu dựa vào phương pháp lý, hóa học và phương pháp quan trắc sinh học. Trong đó, phương pháp quan trắc sinh học được thực hiện trên cơ sở sử dụng các nhóm sinh vật chỉ thị như cá, thực vật bậc cao, thực vật nổi, tảo khuê sống đáy và động vật không xương sống cỡ lớn (ĐVKXSCL). Phương pháp quan trắc chất lượng nước bằng cách sử dụng ĐVKXSCL được sử dụng phổ biến và được ứng dụng rộng rãi ở nhiều quốc gia trên thế giới như Hoa Kỳ, Nam Phi, Úc, các quốc gia liên minh Châu Âu và một số nước Châu Á. Ở các nước đang phát triển, việc quan trắc chất lượng nước ở các sông, suối chủ yếu dựa vào các yếu tố lý, hóa học, các nghiên cứu đánh giá chất lượng nước bằng phương pháp sinh học còn nhiều hạn chế.

Ở Việt Nam, hệ thống điểm BMWP^{VIET} áp dụng cho các thủy vực nước ngọt của Việt Nam dựa trên những chuyển đổi của hệ thống tính điểm BMWP (Biomonitoring Working Party) của Anh và Thái Lan. Sau đó, hệ thống tính điểm BMWP đã được điều chỉnh và bổ sung cho phù hợp với điều kiện nước ta. Đến nay đã có một số nghiên cứu ứng dụng về thành phần ĐVKXSCL và sử dụng chúng làm sinh vật chỉ thị đánh giá chất lượng nước nhưng chỉ chủ yếu tập trung ở khu vực miền Bắc và miền Trung. Do hệ thống điểm BMWP có tính ứng dụng đặc trưng cho từng quốc gia hoặc vùng, miền. Vì vậy, nghiên cứu đã khảo sát, bổ sung và điều chỉnh hệ thống điểm BMWP^{VIET} thành BMWP^{VIET-HR} để đánh giá chất lượng nước trên sông Hậu, kết quả cho thấy có sự tương đồng rất cao về phân mức chất lượng nước giữa hai phương pháp sinh học và phương pháp lý, hóa học. Từ đó qui trình quan trắc chất lượng nước bằng phương pháp sinh học sử dụng ĐVKXSCL được hình thành nhằm triển khai và ứng dụng rộng rãi trong đánh giá chất lượng nước bởi những ưu điểm của phương pháp này.

1.1.1. Sơ lược về động vật không xương sống cỡ lớn

Động vật không xương sống cỡ lớn là những sinh vật có thể nhìn thấy bằng mắt thường, sống ở tầng đáy, trong trầm tích hoặc bò trườn trên mặt nền đáy của các ao, hồ, sông và suối. ĐVKXSCL bao gồm động vật giáp xác, động vật thân mềm (sò, ốc, vẹm, trai sông) và giun nhưng hầu hết là côn trùng thủy sinh. Bộ cánh cứng, chuồn chuồn, chuồn chuồn đá, chuồn chuồn kim, ruồi, và một số loài bướm. Chúng là một phần quan trọng của hệ sinh thái sông/suối. Chúng không chỉ là liên kết quan trọng trong mạng lưới thức ăn giữa sinh vật sản xuất (như lá cây và tảo) mà còn là nguồn thức ăn quan trọng (sinh vật tiêu thụ bậc cao) cho nhiều loài cá, chim và các loài động vật khác. Hơn nữa, nhiều loài côn trùng bay xung quanh trong không trung là động vật không xương sống hầu hết có một giai đoạn trong vòng đời của chúng sống trong nước như động vật không xương sống đáy. Côn trùng trưởng thành thường đẻ trứng vào trong nước. Trứng nở ra thành nhộng hoặc ấu trùng (côn trùng chưa trưởng thành) sống trong nước cho đến khi trưởng thành. Con trưởng thành trồi lên khỏi mặt nước, sau đó bay đi và đẻ trứng trong cùng một dòng sông/suối hoặc ở thủy vực nước chảy khác.

Thành phần loài và mật độ của các quần xã ĐVKXSCL ở sông, suối, ao, hồ, cửa sông có thể không thay đổi lớn từ năm này sang năm khác khi môi trường nước không bị xáo trộn. Tuy nhiên, khi có sự tác động của con người hoặc có sự thay đổi của các yếu tố chất lượng nước như hàm lượng dinh dưỡng, hàm lượng chất hữu cơ, thay đổi tính chất nền đáy và ô nhiễm hóa chất độc hại, từ đó sẽ tạo ra sự khác biệt về thành phần loài và sự phong phú của ĐVKXSCL theo thời gian hoặc không gian. Khi hàm lượng dinh dưỡng trong nước và vật chất hữu cơ cao thường làm giảm tính đa dạng thành phần loài ĐVKXSCL chỉ có những loài có khả năng chịu đựng được mức độ ô nhiễm cao mới tồn tại và gia tăng mật độ. Trong một số trường hợp, ô nhiễm hữu cơ nghiêm trọng, phù sa hoặc ô nhiễm hóa chất độc hại có thể làm giảm hoặc thậm chí loại bỏ toàn bộ quần xã động vật không xương sống khỏi một khu vực bị ảnh hưởng.

1.1.2. Cơ sở khoa học phát triển qui trình

Quan trắc sinh học dựa trên cơ chế tất cả sinh vật sống đều chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố vật lý, hóa học của môi trường sống do vậy việc sử dụng các sinh vật đặc trưng trong môi trường nhằm phản ánh tình trạng chất lượng của môi trường đó. Các sinh vật này được gọi là sinh vật chỉ thị, chúng có thể là một loài hay một nhóm loài và mẫn cảm với điều kiện môi trường, vì vậy khi môi trường biến đổi, các sinh vật này hoặc có mặt hoặc vắng mặt hoặc thay đổi số lượng các cá thể nhằm biểu thị cho những biến đổi của môi trường.

1.1.3. Ưu điểm và nhược điểm của qui trình

1.1.3.1. Ưu điểm

Phương pháp quan trắc sinh học được sử dụng rộng rãi trong đánh giá chất lượng nước bởi các sinh vật chỉ thị có khả năng phản ánh chất lượng nước trong một thời gian dài do đó không cần phải thu mẫu liên tục như phương pháp lý hóa học do, đó tiết kiệm được chi phí. Ngoài ra, phương pháp này còn phản ánh được chất lượng nước trong một phạm vi rộng lớn. Phương pháp sinh học sử dụng ĐVKXSCL thông qua hệ thống điểm BMWP có thuận lợi quan trọng nhất là chỉ thu mẫu định tính mà không cần đếm số lượng cho một đơn vị phân loại.

Hệ thống điểm BMWP sử dụng ĐVKXSCL làm sinh vật chỉ thị dễ dàng ứng dụng hơn so với các nhóm sinh vật khác trong thực tiễn khi đòi hỏi mức độ kỹ năng phân loại tương đối bình thường. Mức độ phân loại được xác định đến bậc họ nhưng cũng có thể chấp nhận đến bộ hoặc ngay cả đến lớp cho một vài nhóm sinh vật.

1.1.3.2. Nhược điểm

Mặc dù quan trắc sinh học có thể phát hiện ra những biến đổi chất lượng nước ở các sinh thái nhưng không xác định được nguyên nhân và giải thích rõ ràng những biến đổi đó. Do vậy, để giải thích nguyên nhân của những biến đổi sinh thái này cần phải kết hợp thêm phương pháp lý hóa học. Quan trắc sinh học sử dụng ĐVKXSCL tuy

có nhiều lợi thế hơn so với phương pháp lý hóa học, tuy nhiên vẫn còn một số hạn chế như:

(1) Dễ bị các yếu tố khác ngoài yếu tố môi trường nước ảnh hưởng đến độ phong phú của chúng,

(2) Chịu ảnh hưởng của mùa vụ nên rất phức tạp trong việc giải thích và so sánh,

(3) Do tính linh hoạt trong di chuyển hoặc do bị trôi dạt nên có thể xuất hiện một số họ không phải ở khu vực lấy mẫu,

(4) Một số họ có trong khu vực lấy mẫu nhưng không có trong hệ thống phân loại.

Ở các nước Đông Nam Á, những kiến thức về phân loại học còn khá hạn chế và đây cũng là một trong những khó khăn trong việc ứng dụng phương pháp quan trắc sinh học sử dụng ĐVKXSCL.

1.1.4. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất

Các dụng cụ và vật liệu nghiên cứu chính bao gồm: Gàu đáy (gàu Petersen), sàng đáy (kích thước mắt lưới 0,5 mm), vợt thu mẫu côn trùng thủy sinh hình chữ D, sàng đáy, chai nhựa lớn, bọc nilon, kẹp gấp mẫu, formaline (37%), ethanol (70-80%), khay nhựa, máy ảnh, máy định vị (GPS)...

1.1.5. Chọn điểm thu mẫu

Trước khi tiến hành thu mẫu ĐVKXSCL cần xác định rõ ràng các thông tin và số liệu cần thu thập. Hiện tại không có một qui định nào về số lượng mẫu cần thu thập cho một nghiên cứu cụ thể. Vì vậy, cần chọn các điểm thu mẫu phù hợp với nội dung và mục tiêu nghiên cứu nhằm thu thập được dữ liệu có chất lượng để đưa ra các quyết định và kết luận đúng đắn.

1.1.6. Chu kỳ thu mẫu

ĐVKXSCL có vòng đời khá dài từ vài tuần đến vài năm nên tùy vào mục đích nghiên cứu có thể thu mẫu với định kỳ 1 tháng/lần hoặc 3 tháng/lần nhưng không ít hơn 2 lần/năm.

1.1.7. Phương pháp thu mẫu

Động vật không xương sống cỡ lớn được thu mẫu chủ yếu bằng gàu đáy Petersen (Hình 1.1) đồng thời kết hợp tìm bắt côn trùng thủy sinh bằng vợt cầm tay. Tại mỗi điểm thu, mẫu được thu 2 bên bờ sông hoặc có thể thu theo mặt cắt ngang của dòng sông. Số lượng gàu thu mẫu tối thiểu là 5 gàu (thông thường thu tổng cộng 10 gàu với tổng diện tích 0,3 m²) tùy vào số lượng động vật đáy có trên nền đáy thủy vực. Mẫu sau khi thu được cho vào sàng đáy có kích thước mắt lưới 0,5 mm, lọc rửa nhằm loại bỏ bùn, rác và những vật chất không cần thiết khác, sau đó mẫu được cho vào bọc nylon hoặc chai nhựa lớn và cố định bằng formaline với nồng độ 5-10% hoặc cồn 70%.



Hình 1.1. Cách thu mẫu động vật đáy: Mẫu được thu bằng gàu đáy (ảnh trái) và mẫu được lọc qua sàng 0,5 mm (ảnh phải)

Mẫu côn trùng thủy sinh được thu bằng vợt cầm tay (kích thước mắt lưới 0,25-0,5 mm) kết hợp tìm bắt các động vật bám vào giá thể hoặc cây cỏ thủy sinh (Hình 1.2). Mẫu côn trùng thủy sinh tại mỗi vị trí khảo sát dùng vợt cầm tay thu ở mặt nước vùng ven bờ nơi có nhiều cây cỏ thủy sinh với diện tích khoảng 20 m², thu 3 lần lặp lại. Lưới thu mẫu được rửa thật sạch trước khi thu ở điểm kế tiếp. Mẫu sau khi thu được cho vào lọ nhựa và cố định bằng formol 5-10% hoặc cồn 70%.



Hình 1.2. Cách thu mẫu côn trùng thủy sinh. Sử dụng vợt cầm tay để thu mẫu (ảnh trái) và tìm bắt những ĐVKXSCL bám vào giá thể và cây cỏ thủy sinh (ảnh phải)

1.1.8. Phương pháp phân tích mẫu

Các mẫu ĐVKXSCL được phân loại tại hiện trường thu mẫu hay ở phòng thí nghiệm, cần tuân theo các qui trình nhất quán. Trước khi xử lý mẫu, hãy chuyển thông tin từ nhãn (gồm ngày thu, địa điểm thu, và các thông tin khác) sang bảng dữ liệu, ghi tên khoa học và số lượng cá thể vào bảng dữ liệu. Đặt mẫu trực tiếp vào khay trắng nông có nước để phân loại. Kiểm tra toàn bộ mẫu và tách các sinh vật riêng biệt sau khi đã loại bỏ các vật chất khác trong mẫu. Các sinh vật được phân loại dưới kính hiển vi soi nổi tùy theo nhu cầu cũng như kinh nghiệm và nguồn lực sẵn có. Định danh các họ ĐVKXSCL bằng phương pháp hình thái. Trước tiên, tách chúng thành các nhóm bậc phân loại khác nhau, xác định ở bậc phân loại thấp nhất để đáp ứng các mục tiêu chất lượng dữ liệu và ghi lại tên khoa học trên bảng dữ liệu. Các nhóm sinh vật thường gặp trong mẫu thu gồm ngành động vật thân mềm (Mollusca) như Gastropoda và Bivalvia, ngành chân khớp (Arthropoda) như lớp Malacostraca.

Đối với ngành giun đốt (Annelida) gồm có lớp Oligochaeta và Polychaeta. Lớp côn trùng thủy sinh (Insecta) có nhiều họ khác nhau nhưng chủ yếu ở giai đoạn ấu trùng. Việc ứng dụng ĐVKXSCL trong quan trắc sinh học thông thường chỉ xác định đến bậc họ. Sau khi phân loại xong, cho động vật vào các lọ riêng theo từng loài/giống/họ và bảo quản ở nồng độ formaline từ 5 đến 10% hoặc cồn 70%. Đặt bên trong lọ các nhãn có ghi số theo dõi mẫu, ngày thu thập, vị trí lấy mẫu và tên các sinh vật. Một số tài liệu phân loại được sử dụng như Đặng Ngọc Thanh

và ctv. (1980), Yunfang (1995), Nguyễn Xuân Quỳnh và ctv. (2001), Sangpradub and Boosoong (2006), Bouchard (2012) và APHA (2017).

1.1.9. Phương pháp áp dụng các chỉ số sinh học để đánh giá hiện trạng chất lượng nước

1.1.9.1. Dựa vào hệ thống điểm $BMWP^{VIET}$ (*Biologica Monitoring Working Party*)

Hệ thống tính điểm $BMWP^{VIET}$ sử dụng ĐVKXSCL làm sinh vật chỉ thị, trong đó các nhóm sinh vật chủ yếu là ĐVKXSCL sống đáy. Trừ lớp giun ít tơ, hệ thống điểm $BMWP$ sử dụng số liệu ở mức độ họ, các họ có khả năng chịu đựng được ô nhiễm càng cao thì giá trị chịu đựng được ô nhiễm (điểm số ô nhiễm) càng thấp. Mỗi họ được quy cho một điểm (dao động từ 1-10) phù hợp với tính nhạy cảm của chúng với các mức độ ô nhiễm hữu cơ khác nhau. Những điểm số riêng được cộng lại thành điểm số tổng của mẫu. Các họ ĐVKXSCL rất nhạy cảm sẽ được quy cho 10 điểm, số điểm này sẽ giảm dần tương ứng với mức độ chịu đựng ô nhiễm của chúng, và thấp nhất là 1 điểm đối với các họ chịu đựng được ô nhiễm cao nhất. Sau đó, dựa vào hệ thống tính điểm $BMWP$ để tính ra điểm trung bình trên bậc họ ASPT (Average Score Per Taxa) nhằm đánh giá chất lượng nước ở các mức độ ô nhiễm khác nhau. Hệ thống điểm $BMWP$ rất có ý nghĩa trong thực tiễn và tương đối dễ dàng áp dụng vì chỉ đòi hỏi về mức độ kỹ năng phân loại tương đối bình thường và được chấp nhận rộng rãi trong quan trắc sinh học.

Hệ thống điểm $BMWP$ khi sử dụng cần điều chỉnh cho phù hợp với từng vùng miền khác nhau. Vì vậy, dựa trên đặc tính phân bố, điều kiện môi trường sống và giá trị chịu đựng ô nhiễm của các họ động vật không xương sống cỡ lớn đã được thiết lập, nghiên cứu đã bổ sung được 24 họ phân bố ở khu vực sông Hậu vào hệ thống điểm $BMWP^{VIET}$ ứng dụng cho lưu vực sông Hậu, gọi là $BMWP^{VIET-HR}$ (Bảng 1.1). Việc đánh giá chất lượng nước bằng phương pháp sinh học sử dụng chỉ số ASPT có sự tương đồng cao (89%) khi so sánh với phương pháp đánh giá chất lượng nước bằng phương pháp lý, hóa học trên sông Hậu.

Bảng 1.1. Chỉ số BMWP^{VIET-HR} ứng dụng cho lưu vực sông Hậu

Tiếng Anh – Việt	Các họ	Điểm
Mayflies/ Phù du	Ephemeroptera: Heptageniidae, Leptophlebiidae, Ephemerllidae, Potamanthidae, Ephemeridae, Oligoneuridae	10
Stoneflies - Cánh úp	Plecoptera: Leuctridae, Perlidae, Perlodidae	
Bugs - Cánh nửa	Hemiptera: Aphelocheiridae	
Damselflies và Dragon flies - Chuồn chuồn	Odonata: Amphipterygidae	
Caddisflies - Bướm đá	Trichoptera: Phryganeidae, Molannidae, Odontoceridae/ Brachycentridae, Leptoceridae, Goeridae, Lepidostomatidae	
Crabs - cua	Crustacea: Potamidae	8
Caddis flies - Bướm đá	Trichoptera: Psychomyiidae, Philopotamidae	
Mayflies - Phù du	Ephenoptera: Caenidae	7
Stoneflies - Cánh úp	Plecoptera: Nemouridae	
Caddisflies - Bướm đá	Trichoptera: Rhyacophilidae, Polycentropodidae, Limnephilidae	

Tiếng Anh – Việt	Các họ	Điểm
Snails - Ốc	Mollusca: Neritidae, Ancyliidae	6
Caddisflies - Bướm đá	Trichoptera: Hydroptilidae	
Dragon flies - Chuồn chuồn	Odonata: Lestidae, Aagriidae (Calopterygidae), Gomphidae, Cordulegastridae, Aeshnidae, Corduliidae/ Libellulidae, Coenagrionidae/Platycnemidae, Chlorocyphidae, Macromidae	
Bugs - Cánh nửa	Hemiptera: Vellidae, Mesovellidae, Hydrometridae, Gerridae, Nepidae, Naucoridae, Notonectidae, Belostomatidae, Hebridae, Pleidae, Corixidae	5
Beetles - Cánh cứng	Coleoptera: Haliplidae, Hygrobiidae, Dytiscidae, Gyrinidae, Hydraenidae, Hydrophilidae, Helodidae, Dryopidae, Elminthidae, Chrysomelidae, Curculionidae, Psephenidae, Ptilodactylidae	
Caddis flies - Bướm đá	Trichoptera: Hydropsychidae	
Dipteran Flies - Hai cánh	Diptera: Tipulidae, Simuliidae	
Mollusca - Thân mềm	Bivalvia: Mytilidae	
Triclads - Sán tiêm mao	Platyheminthes: Planariidae (Dugesiidae)	

Tiếng Anh – Việt	Các họ	Điểm
Mayflies-Phù du	Ephemeroptera: Baetidae/Siphonuridae	4
Alderflies và Dobsonflies – Cánh rộng	Megaloptera: Sialidae, Corydalidae	
Dragonflies - Chuồn chuồn	Odonata: Coenagrionidae, Corduliidae, Libellulidae	
Snails và Bivales -Thân mềm	Mollusca: Pilidae, Unionidae, Viviparidae, Amblemidae, Pyramidellidae*, Stenothyridae*, Pomatiopsidae*, Buccinidae*, Assimineidae*, Mycetopodidae*, Novaculidae*	
Crabs - cua, Prawns - Tôm Isopods - Giáp xác chân đều, Amphipods - Bơi nghiêng	Malacostraca: Anthuridae*, Hymenosomatidae*, Sesarmidae*, Gammaridae*, Hyalidae*, Corophiidae*, Corallanidae*	
Polychaetes - Giun nhiều tơ	Polychaeta: Sabellidae*, Nephtyidae*, Nereididae*, Cossuridae*	
Dipteran Flies - Hai cánh	Diptera: Calliphoridae*, Syrphidae*	
Leeches - Đũa	Oligochaeta: Piscicolidae	

Tiếng Anh – Việt	Các họ	Điểm
True flies - Hai cánh	Diptera: Ephydriidae, Statiomyidae, Blepharoceridae	3
Snails, bivalves - Thân mềm	Mollusca: Hydrobiidae (Bithyniidae), Lymnaeidae, Planorbidae, Thiaridae, Corbiculidae, Sphaeriidae (Pisidiidae), Littorinidae, Arcidae*	
Leeches - Đỉa	Oligochaeta: Glossiphoniidae, Hirudidae, Erpobdellidae	
Crabs - Cua, Prawns - Tôm	Crustacea: Parathelphusidae, Atyidae, Palaemonidae,	
Beetles - Cánh cứng	Coleoptera: Scirtidae*	
Dragon flies - Chuồn chuồn	Odonata: Protoneuridae	
Dipteran Flies - Hai cánh	Diptera: Anthomyiidae*, Sciomyzidae*	
Dipteran Flies - Hai cánh	Diptera: Chironomidae	2
Worms - Giun ít tơ	Oligochaeta (Tất cả lớp)	1

1.1.9.2. Chỉ số trung bình trên bậc họ (Average Score Per Taxon, ASPT)

Đánh giá chất lượng nước bằng chỉ số trung bình trên bậc họ và được trình bày ở bảng 1.2.

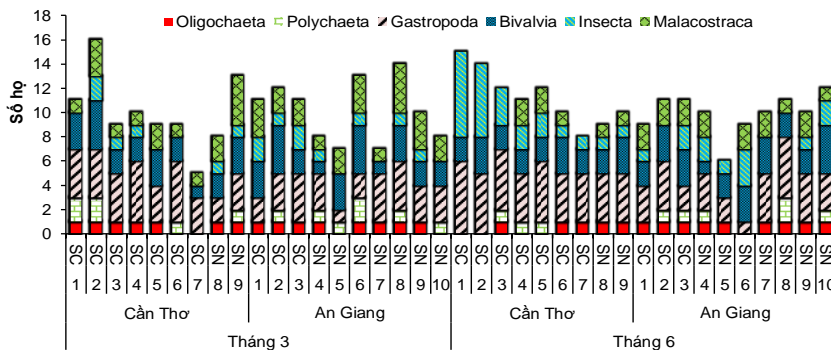
Bảng 1.2. Thang xếp loại chỉ số sinh học ASPT và mức độ ô nhiễm (Environmental Agency, UK, 1997)

Thứ hạng	Chỉ số ASPT	Xếp loại mức độ ô nhiễm
I	10 - 8	Không ô nhiễm, nước sạch
II	7,9 - 6	Ô nhiễm nhẹ
III	5,9 - 5	Ô nhiễm vừa mức β
IV	4,9 - 3	Ô nhiễm vừa mức α (khá ô nhiễm)
V	2,9 - 1	Ô nhiễm nặng
VI	0	Ô nhiễm rất nặng

Ví dụ: Tại một điểm thu đã ghi nhận được tổng cộng 20 họ ĐVKXSCL, dựa vào các điểm của mỗi họ đã được liệt kê ở (Bảng 1.2.), tổng số điểm BMWP của 20 họ được tìm thấy là 49 điểm. Như vậy chỉ số chỉ số ASPT = $49/20 = 2,45 \Rightarrow$ Kết quả là chất lượng nước bị ô nhiễm nặng.

1.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

Trong nghiên cứu về quan trắc sinh học sử dụng ĐVKXSCL tại 19 điểm thu mẫu gồm 9 điểm ở khu vực thành phố Cần Thơ và 10 điểm ở tỉnh An Giang với 2 đợt thu mẫu, tháng 03/2019 và tháng 06/2019. Qua 2 đợt khảo sát nghiên cứu đã ghi nhận được tổng cộng 33 họ ĐVKXSCL.



Hình 1.3. Thành phần họ ĐVKXSCL tại các điểm thu mẫu

Tổng số họ ĐVKXSCL, chỉ số BMWP^{VIET-HR} và ASPT tại các vị trí thu mẫu được trình bày cụ thể ở (Bảng 1.3). Tại các điểm thu mẫu, tổng số họ xác định được dao động từ 5 - 16 họ và 6 - 15 họ tương ứng cho đợt thu tháng 3 và tháng 6. Tổng số điểm BMWP^{VIET-HR} tại các vị trí khảo sát phụ thuộc vào sự hiện diện của các họ trong mẫu thu, các họ càng chịu đựng được sự ô nhiễm hữu cơ thì có số điểm càng thấp. Trong nghiên cứu này, kết quả đã ghi nhận được tổng cộng 33 họ hiện diện ở khu vực khảo sát, các họ được tính điểm bao gồm: 1 họ thuộc Oligochaeta (Naididae), 2 họ thuộc Polychaeta (Nephtyidae, Nereidae), 9 họ thuộc Gastropoda (Ampullariidae, Assimnidae, Buccinidae, Bithyniidae, Lymnaeidae, Thiaridae, Neritidae, Stenothyridae và Viviparidae), 3 họ thuộc Bivalvia (Corbiculidae, Mitilidae, Unionidae), có 4 họ thuộc Insecta (Curculionidae, Gerridae, Lestidae, Libellulidae) và 4 họ thuộc Malacostraca (Atyidae, Parathelphusidae, Sesarmidae, Palaemonidae). Chỉ số BMWP biến động từ 18 - 51 điểm, điểm 2 có số điểm cao nhất (51 điểm) ở đợt tháng 6 và điểm 7 có số điểm thấp nhất (18 điểm) ở đợt tháng 3.

Từ kết quả của chỉ số BMWP, nghiên cứu đã tính toán và sử dụng chỉ số sinh học ASPT để đánh giá chất lượng nước tại các điểm thu mẫu qua 2 đợt khảo sát. Chỉ số ASPT ở vùng nghiên cứu dao động từ 2,6 - 4,9 (Bảng 1.3). Vào tháng 3, chỉ số ASPT dao động từ 3,0 - 4,9 cho kết quả chất lượng nước ở 19 điểm thu tại An Giang và Cần Thơ đều có mức độ ô nhiễm trung bình (TB). Thời điểm tháng 6, chỉ số ASPT dao động từ 2,6 - 4,0 thấp hơn so với đợt tháng 3, trong đó có 5 điểm trên tổng số 19 điểm bị ô nhiễm nặng với chỉ số ASPT biến động từ 2,6 - 2,9. Tất cả các điểm còn lại chất lượng nước đều có mức độ ô nhiễm trung bình.

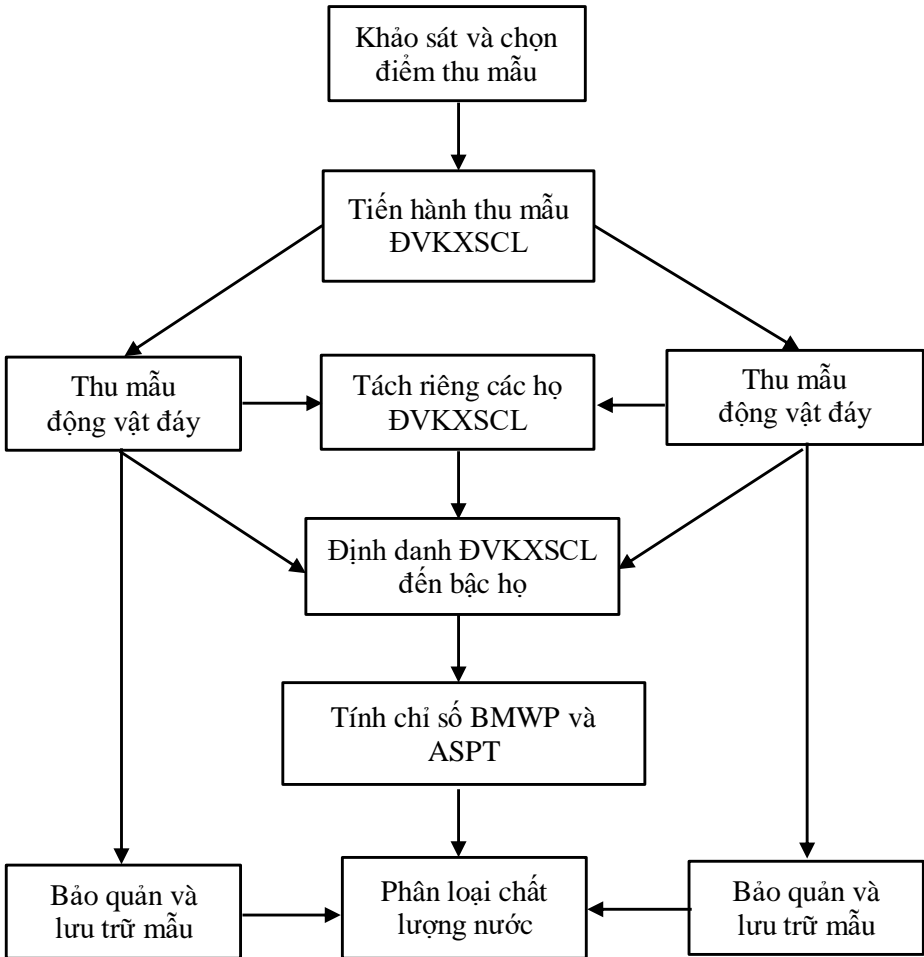
Như vậy qua 2 đợt khảo sát trên tổng cộng 19 điểm thu mẫu ở khu vực sông Hậu, kết quả cho thấy phân mức chất lượng nước biến động từ ô nhiễm trung bình đến ô nhiễm nặng. Mức độ ô nhiễm nước có xu hướng gia tăng ở một số điểm thu mẫu vào tháng 6. Kết quả này là cơ sở dữ liệu cho việc quản lý chất lượng nước nhằm có biện pháp giảm thiểu mức độ ô nhiễm nước vùng NTTS trên sông Hậu.

Bảng 1.3. Điểm BMWPVIET-HR, ASPT và đánh giá chất lượng nước tại các vị trí khảo sát

Tháng 3					Tháng 6				
Điểm thu	Số hộ	Điểm BMWP	Điểm ASPT	Phân mức CLN	Điểm thu	Số hộ	Điểm BMWP	Điểm ASPT	Phân mức CLN
1	11	39	3,5	TB	1	15	43	2,9	Nặng
2	16	48	3,0	TB	2	14	51	3,6	TB
3	9	39	4,3	TB	3	12	46	3,8	TB
4	10	42	4,2	TB	4	11	39	3,5	TB
5	9	38	4,2	TB	5	12	42	3,5	TB
6	9	29	3,2	TB	6	10	32	3,2	TB
7	5	18	3,6	TB	7	8	24	3,0	TB
8	8	28	3,5	TB	8	9	26	2,9	Nặng
9	13	45	3,5	TB	9	10	27	2,7	Nặng
10	11	45	4,1	TB	10	9	23	2,6	Nặng
11	12	49	4,1	TB	11	11	30	2,7	Nặng
12	11	47	4,3	TB	12	11	37	3,4	TB
13	8	39	4,9	TB	13	10	35	3,5	TB
14	7	29	4,1	TB	14	6	22	3,7	TB
15	13	45	3,5	TB	15	9	28	3,1	TB
16	7	30	4,3	TB	16	10	39	3,9	TB
17	14	48	3,4	TB	17	11	44	4,0	TB
18	10	40	4,0	TB	18	10	35	3,5	TB
19	8	35	4,4	TB	19	12	41	3,4	TB

1.3. TÓM TẮT QUI TRÌNH

Quy trình quan trắc sinh học sử dụng ĐVKXSCL có thể được tóm tắt như sau:



Hình 1.4. Tóm tắt quy trình quan trắc sinh học sử dụng ĐVKXSCL

1.4. KẾT LUẬN

Quy trình quan trắc sinh học sử dụng ĐVKXSCL đã được hoàn thiện, triển khai ứng dụng hiệu quả ở vùng NTTS trên sông Hậu và có thể được ứng dụng rộng rãi trong quan trắc chất lượng nước trong cùng điều kiện sinh thái ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

QUI TRÌNH 2

QUAN TRẮC SINH HỌC MÔI TRƯỜNG NƯỚC DỰA TRÊN PHIÊU SINH ĐỘNG VẬT

2.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

2.1.1. Giới thiệu

Hiện nay có nhiều phương pháp đánh giá chất lượng nước khác nhau, trong đó phương pháp sinh học đã được sử dụng khá rộng rãi ở nhiều quốc gia trên thế giới. Các nhóm sinh vật được sử dụng làm sinh vật chỉ thị trong quan trắc chất lượng nước như động vật không xương sống cỡ lớn, phiêu sinh thực vật, tảo bám và phiêu sinh động vật (PSĐV). Một số nghiên cứu cho thấy phiêu sinh động vật có tiềm năng làm sinh vật chỉ thị trong quan trắc sinh học, tuy nhiên các nghiên cứu về thành phần loài cũng như khả năng ứng dụng của chúng chưa được thực hiện nhiều, đặc biệt ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

Phiêu sinh động vật là thành phần chủ yếu trong chuỗi thức ăn và giữ vai trò quan trọng trong việc chuyển hóa năng lượng trong hệ sinh thái thủy sinh. Chúng có vòng đời ngắn, từ 1 ngày đến vài tuần và nhạy cảm với những biến động của các thông số chất lượng nước. Phiêu sinh động vật (PSĐV) có kích thước lớn hơn nên dễ dàng xác định hơn so với phiêu sinh thực vật. Một số nghiên cứu cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa mức độ dinh dưỡng trong nước và cấu trúc quần thể PSĐV, trong đó luân trùng là sinh vật chỉ thị tốt nhất về mức độ dinh dưỡng khi so sánh với các nhóm sinh vật khác. Mặt khác, khi môi trường nước bị ô nhiễm thì thành phần loài PSĐV có xu hướng giảm. Một số loài không được tìm thấy trong các vực nước bị ô nhiễm nặng mặc dù chúng có khả năng chịu đựng được mức độ ô nhiễm cao. Sự thay đổi về mức độ phong phú và tính đa dạng thành phần loài của quần xã PSĐV có thể cung cấp các dấu hiệu quan trọng về những biến động của môi trường nước. Do đó, PSĐV được sử dụng làm sinh vật chỉ thị trong quan trắc chất lượng nước.

Trong nuôi trồng thủy sản, chất lượng nước đóng vai trò quan trọng cho sự thành công của các mô hình nuôi. Tùy vào năng lực quản lý cũng như điều kiện trang thiết bị của địa phương, có thể ứng dụng các biện pháp đánh giá chất lượng nước khác nhau. Vì vậy, qui trình này được thực hiện nhằm góp phần đa dạng hóa các hình thức quan trắc chất lượng nước vùng nuôi trồng thủy sản nói riêng và trên sông Hậu nói chung.

2.1.2. Sơ lược về phiêu sinh động vật

Phiêu sinh động vật là những sinh vật phù du dị dưỡng, sống trôi nổi ở các hệ sinh thái khác nhau ở cả môi trường nước ngọt và lợ - mặn như các ao, hồ, sông, suối, biển, đại dương. Các cá thể PSDV thường có kích thước khá nhỏ, không thể quan sát bằng mắt thường, nhưng một số khác có kích thước rất lớn. PSDV gồm có các nhóm chính như động vật nguyên sinh (Protozoa), trùng bánh xe hay luân trùng (Rotifera), giáp xác râu ngành (Cladocera), giáp xác chân mái chèo (Copepoda), giáp xác có vỏ (Ostracoda) và một số nhóm ít gặp khác có giai đoạn sống nổi tạm thời trong vòng đời của chúng như các nhóm ấu trùng của hai mảnh vỏ (Bivalvia), chân bụng (Gastropoda), giáp xác lớn (Malacostraca), giun nhiều tơ (Polychaeta), côn trùng thủy sinh (Insecta). Quần xã PSDV là thành phần quan trọng trong chuỗi thức ăn, chúng là nguồn thức ăn cho các sinh vật có kích thước lớn hơn. Những thay đổi về thành phần loài và mức độ phong phú của PSDV có liên quan đến sự thay đổi chất lượng nước và thể hiện tình trạng chất lượng nước nơi chúng phân bố. Vì vậy, chúng được xem là sinh vật chỉ thị trong quan trắc chất lượng nước.

2.1.3. Ưu điểm và nhược điểm của qui trình

2.1.3.1. Ưu điểm

Phương pháp quan trắc sinh học sử dụng PSDV ngày nay đang được phát triển và ứng dụng trong đánh giá chất lượng nước do:

(1) Chúng thường nhạy cảm với những biến động của các thông số chất lượng nước;

(2) Dễ thu thập mẫu với phương pháp đơn giản;

(3) Hệ thống phân loại về PSDV khá phát triển là điều kiện thuận lợi trong định danh thành phần loài PSDV;

(4) Phương pháp xác định mật độ PSDV đã được hoàn thiện;

(5) Nhóm sinh vật phân bố rộng trong môi trường nước.

2.1.3.2. Nhược điểm

Mặc dù quan trắc sinh học có thể phát hiện ra những biến đổi chất lượng nước ở các sinh thái nhưng không xác định được nguyên nhân và giải thích rõ ràng những biến đổi đó. Vì vậy, đánh giá chất lượng nước bằng cách sử dụng PSDV làm sinh vật chỉ thị được xác định tốt nhất khi kết hợp đồng thời với các dữ liệu sinh học và lý, hóa học khác.

2.1.4. Dụng cụ, trang thiết bị và hóa chất

Các dụng cụ và vật liệu nghiên cứu chính bao gồm: Lưới PSDV có kích thước mắt lưới 60 μm , chai trữ mẫu có thể tích từ 100-200 ml, formaline (37 - 40%), xô nhựa, ca nhựa, máy định vị (GPS), kính hiển vi, buồng đếm Sedgewick-Rafter, lame, lamelle, ống đồng và cốc thủy tinh.

2.1.5. Chọn điểm thu mẫu

Trước khi tiến hành thu mẫu PSDV cần xác định rõ ràng các thông tin và số liệu cần thu thập. Hiện tại không có một qui định nào về số lượng mẫu cần thu thập cho một nghiên cứu cụ thể. Các điểm thu mẫu cần đại diện cho một thủy vực, một sinh cảnh hoặc vùng nghiên cứu.

Nếu có thể xác định hoặc giả định chính xác sự phân bố của phiêu sinh động vật là đồng nhất, phương pháp chọn điểm thu mẫu ngẫu nhiên được áp dụng để có thể xử lý thống kê trong quá trình phân tích số liệu. Mặt khác, nếu cho rằng sự phân bố của PSDV không đồng nhất, cần lấy mẫu bổ sung các điểm thu này, gia tăng số lần lặp lại.

Sử dụng các phương pháp xử lý thống kê thích hợp để xác định sự biến thiên của quần thể. Vì vậy, cần chọn các điểm thu mẫu phù hợp với nội dung và mục tiêu nghiên cứu nhằm thu thập được dữ liệu đầy đủ và chất lượng, từ đó đưa ra các quyết định và kết luận đúng đắn.

2.1.6. Chu kỳ thu mẫu

Phiêu sinh động vật có vòng đời khá ngắn, nên tùy vào mục đích nghiên cứu có thể thu mẫu hàng ngày, định kỳ 3 ngày/lần, 1 tuần/lần, 2 tuần/lần, 1 tháng/lần, hoặc 3 tháng/lần nhưng không ít hơn 4 lần/năm.

2.1.7. Thời gian thu mẫu

Thời gian thu mẫu PSDV tốt nhất là vào buổi sáng (từ 7 giờ đến 10 giờ)

2.1.8. Phương pháp thu mẫu

2.1.8.1. Phương pháp thu mẫu định tính

Mẫu định tính phiêu sinh động vật được thu bằng cách sử dụng lưới phiêu sinh có kích thước mắt lưới 50 - 63 μm . Dùng vợt lưới đặt cách mặt nước từ 20 - 50 cm (các dòng sông lớn có thể thu cách mặt nước từ 0,5 - 1 m) thu ở các điểm khác nhau trong thủy vực, thông thường thu ít nhất 5 điểm cho một vị trí lấy mẫu, thể tích nước được lọc qua lưới lọc càng nhiều càng tốt. Chú ý trong quá trình thu mẫu cần kéo lưới với tốc độ phù hợp nhằm cho nước đi qua lưới lọc và phiêu sinh vật được giữ lại bên trong lưới. Việc bảo quản mẫu được tiến hành ngay sau khi hoàn tất quá trình thu mẫu (trong vòng 30 phút), nếu vì một lí do nào đó mẫu không được cố định thì cần loại bỏ thu mẫu lại. Mẫu sau khi thu được cho vào chai nhựa có thể tích 100 - 200 mL và cố định bằng formaline với nồng độ 4%. Ngoài ra, có thể bảo quản mẫu bằng ethanol 70%. Thời gian bảo quản mẫu có thể từ vài tháng đến vài năm, tuy nhiên quá trình phân tích mẫu nên được thực hiện tốt nhất trong vòng 6 tháng.

Công thức tính lượng formaline cần cố định:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Trong đó: N_1 : Nồng độ formaline thương mại (37 - 40%)

V_1 : Thể tích formaline thương mại

N_2 : Nồng độ formaline cần cố định

V_2 : Thể tích mẫu cần cố định

Ví dụ: Để có định mẫu có thể tích 200 mL, nồng độ 4% thì cần sử dụng lượng formaline là 20 mL

$$V_1 = \frac{N_2 \times V_2}{N_1} = \frac{4\% \times 200 \text{ mL}}{40\%} = 20 \text{ mL}$$

Khi thu mẫu ở các sông chính và sông nhánh cần xác định vị trí các điểm thu ở thượng nguồn và hạ nguồn từ các nguồn nghi ngờ ô nhiễm và các dòng phụ lưu chính với các khoảng thời gian thích hợp trong phạm vi nghiên cứu. Nếu có thể, nên thu mẫu ở cả hai bên sông vì sự pha trộn nguồn nước có thể không xảy ra ở các vị trí cách xa về phía hạ nguồn. Khu vực có nguồn nước pha trộn theo chiều dọc và chiều ngang có thể chỉ thu mẫu ở giữa dòng. Ngoài ra, có thể thu mẫu theo mặt cắt ngang của dòng sông, nghĩa là tại mỗi vị trí sẽ thu từ bờ bên này sang bờ bên kia. Tương tự, ở các sông nhánh việc thu mẫu ở các điểm có nghi ngờ bị ô nhiễm cần chú ý đến các nguồn tác động xung quanh do PSDV có thể có nguồn gốc phát sinh từ các nguồn ô nhiễm này và bị phát tán bởi dòng chảy. Đối với các ao có diện tích lớn, cần thu ở 4 góc ao và từ 1 đến 2 điểm giữa ao, hoặc có thể thu theo đường chéo của ao. Quá trình thu mẫu cần tránh các khu vực bùn lầy, nước đọng mang tính chất cục bộ, điều đó không phản ánh được điều kiện môi trường đại diện của vùng nghiên cứu.



Bảo quản
mẫu bằng
formaline
(4%)



Hình 2.1. Cách thu mẫu định tính phiêu sinh động vật

2.1.8.2. Phương pháp thu mẫu định lượng

Mẫu định lượng PSDV được thu bằng phương pháp thu lọc. Phương pháp này được tiến hành bằng cách dùng xô nhựa 20 lít thu ở các điểm khác nhau trong thủy vực, sau đó cho lần lượt qua lưới phiêu sinh động vật (60 μm) với thể tích nước qua lưới lọc thông thường là 200 lít đối với thủy vực tự nhiên như ao hồ, sông, suối, vùng cửa sông, vùng ven biển,

và 100 lít đối với các ao nuôi thủy sản do nguồn nước có hàm lượng dinh dưỡng cao, nên có mật độ PSDV khá cao. Các cá thể PSDV có thể bám ở bên trong mặt lưới, vì vậy cần chú ý thao tác làm sạch lưới để toàn bộ PSDV đi hết vào trong bình chứa mẫu được gắn ở bên dưới của lưới thu mẫu nhằm hạn chế sai số trong quá trình thu mẫu. Mẫu sau khi thu được cho vào chai nhựa có thể tích từ 100 - 200 mL và cố định bằng formaline với nồng độ 4%. Lưới PSDV cần được rửa sạch trước khi thu ở các vị trí tiếp theo.



Hình 2.2. Cách thu mẫu định lượng phiêu sinh động vật

Trong quá trình thu mẫu cần ghi nhận lại một số thông tin về hiện trạng các điểm thu mẫu như: Thời gian thu mẫu, nguồn tác động ở các khu vực xung quanh, màu nước, điều kiện thời tiết, mức độ che phủ của cây cỏ thủy sinh. Đối với các ao nuôi thủy sản thì cần ghi rõ đối tượng nuôi, giai đoạn nuôi, quá trình quản lý chăm sóc ao nuôi... nhằm làm cơ sở để giải thích kết quả nghiên cứu.

2.1.9. Phương pháp phân tích mẫu

2.1.9.1. Phân tích mẫu định tính

Mục đích của phân tích mẫu định tính là nhằm xác định thành phần loài PSDV có trong mẫu thu.

Mẫu sau khi thu được đưa về phòng thí nghiệm để tiến hành phân tích. Xác định tên các giống/loài PSDV bằng phương pháp hình thái và cần tuân theo các qui trình nhất quán. Mẫu khi cố định bằng formol thì hầu hết các phiêu sinh vật sẽ lắng xuống đáy lọ, do vậy để dễ dàng tìm thấy các PSDV có trong mẫu thu, trước tiên dùng ống hút nhựa lấy mẫu ở đáy lọ và cho vào lame kính, lưu ý mẫu không nên quá đặc cũng không

quá loãng. Quan sát mẫu dưới kính hiển vi ở độ phóng đại phù hợp, thông thường ở vật kính 10X và 40X tương ứng với độ phóng đại 100 lần và 400 lần tùy thuộc vào từng loài khác nhau. Sau đó, dựa vào các tài liệu phân loại đã được công bố để định danh tên giống/loài của các PSDV. Việc tìm kiếm mẫu và định danh tên các giống/loài PSDV chỉ dừng lại cho đến khi lame mẫu lặt đi lặt lại nhiều lần mà không xuất hiện loài mới. Các tài liệu phân loại thường được sử dụng như Shirota (1966), Đặng Ngọc Thanh và ctv. (1980), Yunfang (1995), Nguyễn Văn Khôi (2001), Phan et al. (2015) và APHA (2017).

2.1.9.2. Phân tích mẫu định lượng

Mục đích của phân tích mẫu định lượng là nhằm xác định mật độ PSDV có trong mẫu thu. Tùy vào mục đích nghiên cứu và năng lực nghiên cứu có thể xác định mật độ PSDV ở bậc loài, giống, hoặc ngành.

Phương pháp định lượng PSDV được thực hiện theo phương pháp của Boyd and Tucker (1992), và tiến hành gồm 3 bước:

Bước 1: Tiến hành cô đặc mẫu bằng cách dùng ống hút nhựa một đầu có bịt lưới phiêu sinh động vật (60 μm) để hút bớt nước trong mẫu ra đến khi đạt thể tích phù hợp. Thể tích mẫu cô đặc tùy thuộc vào mức độ phong phú của PSDV có trong mẫu thu. Thể tích mẫu cô đặc thông thường khoảng từ 30 - 60 mL. Các thủy vực giàu dinh dưỡng, mật độ PSDV thường cao, khi đó thể tích mẫu cô đặc cao, ngược lại thủy vực có mức độ dinh dưỡng thấp, mật độ PSDV thường thấp hơn, thể tích mẫu cô đặc cũng thấp hơn.

Bước 2: Dùng ống hút nhựa khuấy đều mẫu vừa cô đặc và cho vào buồng đếm Sedgewick–Rafter, thể tích mẫu cho vào buồng đếm là 1 mL. Buồng đếm có dạng hình chữ nhật với tổng cộng 1.000 ô, trong đó chiều ngang có 20 ô và chiều dài có 50 ô, mỗi cạnh của 1 ô dài 1 mm, diện tích 1 ô là 1 mm^2 .

Thông thường khi cho mẫu vào buồng đếm, tiến hành đếm số lượng cá thể PSDV theo loài, giống, hoặc ngành. Tiến hành đếm theo 3 đường ngang (mỗi đường có 20 ô x 3 là 60 ô) cho 1 lần lấy mẫu, tiếp tục lấy mẫu đếm lặp lại 3 lần với tổng cộng 180 ô. Nếu tổng số cá thể PSDV

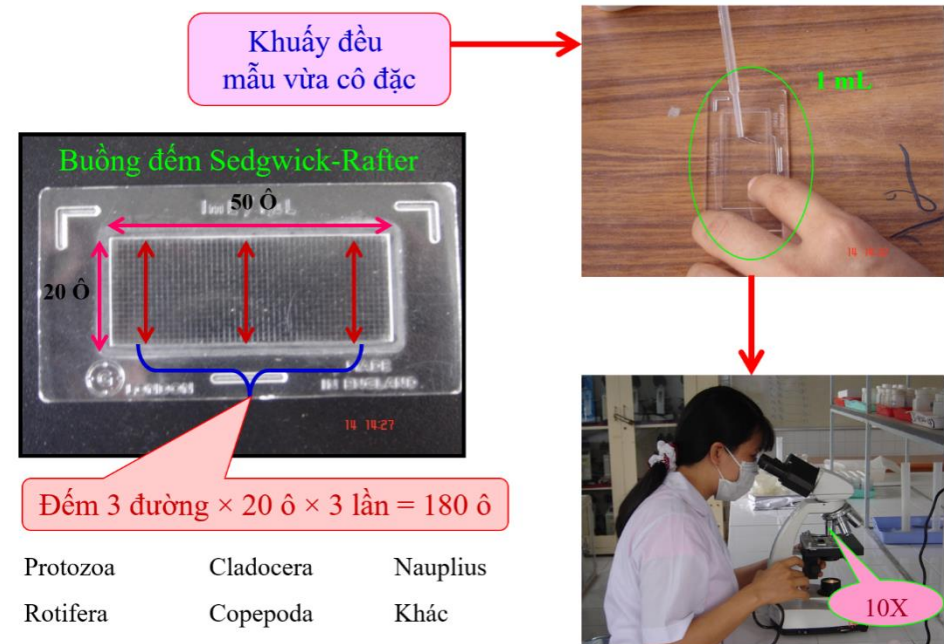
đếm được vẫn còn khá ít, chưa đạt từ 200 - 400 cá thể trở lên thì tiếp tục lấy mẫu đếm cho đến khi đạt số lượng thích hợp. Ghi nhận lại số ô đã đếm. Lưu ý số cá thể đếm được càng nhiều thì kết quả càng chính xác. Trong trường hợp, số cá thể đếm được khá thấp thì cần cô đặc lại mẫu (thực hiện lại bước 1) cho đến khi đạt thể tích phù hợp.

Bước 3: Xác định mật độ PSDV theo công thức sau đây:

$$X = \frac{T \times 1000 \times V_{cd}}{A \times N \times V_{mt}} \times 10^6$$

Trong đó: X là mật độ PSDV (cá thể/m³); T là số cá thể đếm được theo từng theo loài/giống/ngành; V_{cd} là thể tích mẫu cô đặc (mL); A là diện tích 1 ô đếm (1 mm²); N là số ô đếm; và V_{mt} là thể tích mẫu thu qua lưới lọc (mL).

Lưu ý: Để hạn chế sai số trong quá trình đếm mẫu, các mẫu định lượng PSDV nên được đếm cùng một phương pháp nhất định.



Hình 2.3. Phương pháp đếm số lượng PSDV

2.1.9.3. Các chỉ số sinh học sử dụng trong quan trắc sinh học

Các chỉ số sinh học gồm chỉ số đa dạng Shannon-Weiner (H') thường được sử dụng để xác định tính đa dạng thành phần loài PSDV và đánh giá chất lượng nước. Chỉ số tương đồng Sorencen dùng để đánh giá sự tương đồng thành phần loài PSDV giữa các điểm khảo sát. Chỉ số đồng đều Pielou cho thấy mức độ phân bố về mật độ của các loài PSDV trong quần xã. Việc xác định loài ưu thế sử dụng công thức tính chỉ số ưu thế của Berger-Parker (d). Công thức tính của các chỉ số sinh học được thể hiện ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các chỉ số sinh học ứng dụng trong quan trắc sinh học sử dụng PSDV

	Các chỉ số	Công thức tính	Mô tả
	Chỉ số đa dạng Shannon-Weiner (H')	$H' = - \sum P_i \times \ln P_i$	$P_i = n_i/N$ n_i là số lượng cá thể của loài thứ i N là tổng số cá thể của PSDV
	Chỉ số Margalef (d)	$d = \frac{S-1}{\ln N}$	S là tổng số loài N là tổng số cá thể của PSDV
	Chỉ số ưu thế Berger-Parker (D)	$D = \frac{N_{Max}}{N}$	N_{Max} là tổng số cá thể của loài có số lượng cao nhất N là tổng số cá thể của PSDV
	Chỉ số đồng đều Pielou's (J')	$J' = \frac{H'}{\ln S}$	H' là chỉ số đa dạng Shannon-Weiner S là tổng số loài của PSDV

Bảng 2.2. Phân mức chất lượng nước dựa vào chỉ số đa dạng Shannon-Weiner (H')

Chỉ số đa dạng	Stau et al. (1970)	Zheng et al. (2007)	Ren et al. (2011)
>4,5		ÔN rất nhẹ	
3,0-4,5	ÔN rất nhẹ	ÔN nhẹ	ÔN nhẹ
2,0-3,0	ÔN nhẹ	ÔN TB	ÔN TB mức β
1,0-2,0	ÔN TB	ÔN nặng	ÔN TB mức α
0,0-1,0	ÔN nặng	ÔN rất nặng	ÔN nặng

Ghi chú: ÔN là ô nhiễm và TB là trung bình

Bảng 2.3. Đánh giá mức độ dinh dưỡng của thủy vực dựa vào mật độ PSDV (Zheng et al., 2007)

STT	Mật độ (ct/m ³)	Mức độ dinh dưỡng
1	<1.000.000	Dinh dưỡng thấp
2	1.000.000 - 3.000.000	Dinh dưỡng trung bình
3	> 3.000.000	Giàu dinh dưỡng

2.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

2.2.1. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện vào tháng 3/2019 tại 19 điểm trên sông Hậu thuộc tỉnh An Giang và thành phố Cần Thơ. Các điểm thu mẫu được nghiên cứu phần lớn nằm ở xung quanh khu vực bị ảnh hưởng bởi các hoạt động nuôi trồng thủy sản. Vị trí và tọa độ các điểm thu mẫu được thể hiện ở bảng 2.4.

Bảng 2.4. Tọa độ các điểm thu mẫu trên sông Hậu

STT	Điểm thu	Ký hiệu	Tọa độ		Thủy vực
Tỉnh An Giang					
1	Cồn Khánh Hòa	1	10 ^o 41.406'	105 ^o 11.704'	SC
2	Bến Phà Rạch Gọc	2	10 ^o 28.706'	105 ^o 20.358'	SC
3	Bến Phà Sơn Đốt	3	10 ^o 26.751'	105 ^o 23.408'	SC
4	Vĩnh Ngươn	4	10 ^o 44.103'	105 ^o 06.333'	SN
5	Cầu Vĩnh Tre	5	10 ^o 37.117'	105 ^o 12.574'	SN
6	Cầu chữ S	6	10 ^o 34.875'	105 ^o 13.768'	SN
7	Kênh Ông Cò	7	10 ^o 19.438'	105 ^o 19.811'	SN
8	Kênh Tây An	8	10 ^o 20.502'	105 ^o 26.956'	SN
9	Kênh Cái Sao 2	9	10 ^o 18.576'	105 ^o 26.122'	SN
10	Kênh Cái Sao 1	10	10 ^o 19.969'	105 ^o 27.644'	SN
TP Cần Thơ					
11	Bến phà Bò Ót	11	10 ^o 18'07.7"	105 ^o 30'40.9"	SC
12	Bến phà Trà Uối	12	10 ^o 17.201'	105 ^o 31.322'	SC
13	Thuận Hưng	13	10 ^o 13.290'	105 ^o 35.155'	SC
14	Thới An	14	10 ^o 08.964'	105 ^o 39.236'	SC
15	Cồn Khương	15	10 ^o 04.044'	105 ^o 46.671'	SC

STT	Điểm thu	Ký hiệu	Tọa độ		Thủy vực
16	Cái Cui	16	09 ^o 59.564'	105 ^o 49.579'	SC
17	Cái Côn	17	09 ^o 55.653'	105 ^o 53.990'	SC
18	Thạnh Mỹ- Vĩnh Thạnh	18	10 ^o 14.276'	105 ^o 24.164'	SN
19	Sông Cái Sắn- Vĩnh Trinh	19	10 ^o 17.659'	105 ^o 27.483'	SN

Ghi chú: SC: Sông chính và SN: Sông nhánh

2.2.2. Thành phần phiêu sinh động vật trên sông Hậu

2.2.2.1. Tổng số loài phiêu sinh động vật trên sông Hậu

Nghiên cứu đã ghi nhận được tổng cộng 106 loài PSDV ở khu vực sông Hậu, trong đó Rotifera có thành phần loài phong phú nhất với 39 loài (43%), kế đến là Protozoa (28 loài, 28%), các nhóm còn lại có số loài biến động từ 10 - 14 loài (9-13%). Kết quả này tương đối cao hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Thị Kim Liên và ctv. (2014) về thành phần PSDV trên sông Hậu thuộc tỉnh Hậu Giang và Sóc Trăng, kết quả đã xác định được 97 loài PSDV, trong đó Rotifera cũng có thành phần loài cao hơn (45 loài) các nhóm khác. Do khu vực nghiên cứu có một số điểm thu mẫu thuộc tỉnh Sóc Trăng là thủy vực nước lợ, nên một số loài phân bố đặc trưng ở môi trường nước ngọt không được tìm thấy. Rotifera có đặc tính phân bố chủ yếu trong môi trường nước ngọt nên có thành phần loài cao hơn các nhóm khác và là sinh vật chỉ thị cho môi trường nước giàu dinh dưỡng (Berzins & Pejler, 1987). Các giống loài thường gặp như *Brachionus angularis*, *B. caudatus*, *B. calyciflorus*, *B. falcatus*, *Filinia terminalis*, *Polyarthra vulgaris* và *Philodina roseola*. Tương tự như Rotifera, Cladocera là thành phần quan trọng trong hệ sinh thái nước ngọt, chúng là nguồn thức ăn cho các loài cá sống nổi và động vật không

xương sống, Cladocera ăn chủ yếu là tảo và các mảnh vụn hữu cơ và giữ vai trò quan trọng trong chu trình dinh dưỡng của hệ sinh thái thủy sinh và là sinh vật chỉ thị môi trường nước có mức độ dinh dưỡng trung bình (Hall et al., 1997). Các loài thường gặp là *Bosmina longirostris*, *Bosminopsis deitersi*, *Moina macrocopa*. Copepoda thường có thành phần loài đa dạng hơn ở môi trường nước lợ - mặn nên số loài ghi nhận được thấp hơn (9 loài, 10%) các nhóm khác. Nhìn chung, PSDV nước ngọt là thành phần sinh học quan trọng và được sử dụng làm sinh vật chỉ thị mức độ dinh dưỡng và đánh giá sức khỏe sinh thái do chúng có kích thước lớn hơn và dễ dàng xác định hơn so với thực vật nổi. Sự hiện diện của PSDV, khả năng tồn tại và phản ứng của chúng với những thay đổi của các điều kiện môi trường khác nhau và vì vậy chúng được sử dụng làm sinh vật chỉ thị cho các nghiên cứu về ô nhiễm nước (Boltovskoy, 1999; Deibel, 1994).

2.2.2.2. Thành phần phiêu sinh động vật trên sông chính, sông nhánh và tại các vị trí thu mẫu trên sông Hậu

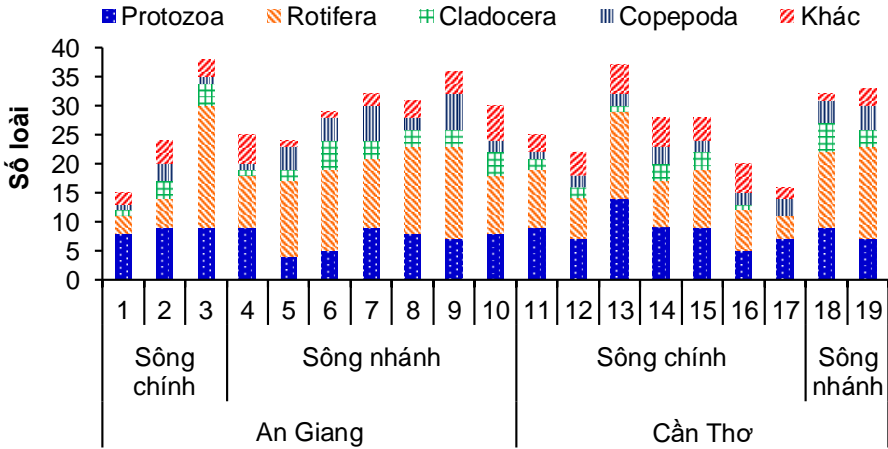
Tổng số loài PSDV ghi nhận được ở sông chính và sông nhánh biến động từ 46 - 70 loài. Ở sông chính, thành phần loài PSDV xác định được không có sự biến động lớn giữa khu vực An Giang và TP Cần Thơ (51 và 55 loài), trong khi đó tổng số loài PSDV trên sông nhánh ở khu vực tỉnh An Giang cao hơn nhiều so với TP Cần Thơ (70 loài và 46 loài). Hàm lượng nitrate (NO_3^-) tại các điểm thu ở tỉnh An Giang có xu hướng cao hơn so với các điểm thu ở TP Cần Thơ, môi trường nước có hàm lượng dinh dưỡng cao là điều kiện tốt cho tảo phát triển, từ đó làm thức ăn cho PSDV. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hàm lượng Chlorophyll-a có mối tương quan thuận với mật độ của các nhóm PSDV, đặc biệt tương quan thuận có ý nghĩa với các nhóm Protozoa ($P < 0,05$), Nauplius và Copepoda ($P < 0,05$). Rotifera luôn có thành phần loài phong phú hơn các nhóm PSDV khác ở hầu hết các khu vực thu mẫu và biến động từ 20 - 33 loài, các nhóm còn lại như Protozoa dao động từ 11-16 loài, Cladocera từ 3 - 8 loài, và các nhóm khác từ 3 - 8 loài. Tuy nhiên, nếu so sánh về tổng số loài PSDV phân bố trên sông chính và sông nhánh ở khu vực sông Hậu thì thành phần loài không có sự khác biệt lớn với

tổng cộng là 73 loài và 76 loài được tìm thấy lần lượt cho sông chính và sông nhánh.

Thành phần loài PSDV biến động lần lượt từ 15 - 38 loài và 16 - 37 loài tương ứng cho khu vực tỉnh An Giang và TP Cần Thơ, kết quả này cho thấy thành phần loài PSDV không có sự khác biệt lớn giữa hai khu vực lấy mẫu. Trên sông chính, thành phần loài PSDV biến động khá cao (15 - 38 loài), các điểm thu có số loài thấp nhất thuộc tuyến sông chính gồm các điểm 1 (cồn Khánh Hòa) và điểm 17 (Cái Côn) với số loài lần lượt là 15 loài và 16 loài. Đây cũng là các vị trí có mật độ PSDV đạt thấp nhất. Số loài PSDV cũng đạt cao nhất tại các điểm thu trên sông chính tại các điểm 3 (Bến đò Sơn Đốt) và điểm 13 (Thuận Hưng) từ 37 - 38 loài. Mặc dù các vị trí này có thành phần loài cao nhất tuy nhiên mật độ PSDV đạt được cũng không cao hơn nhiều so với các điểm thu khác. Kết quả này cho thấy biến động thành phần loài và mật độ PSDV tuân theo qui luật ưu thế về sự phân bố của thủy sinh vật. Ngành Rotifera có thành phần loài cao hơn các nhóm khác (3 - 21 loài), là nhóm sinh vật phân bố đặc trưng cho môi trường nước ngọt, thích nghi với môi trường nước có mức độ dinh dưỡng cao và sự ưu thế của Rotifera phụ thuộc vào mức độ dinh dưỡng của thủy vực (Ismail & Adnan, 2016). Cladocera có số loài khá thấp, ghi nhận được từ 1- 4 loài, trong đó hai loài *Bosmina longirostris*, *Bosminopsis deitersi* xuất hiện thường xuyên tại các điểm thu mẫu, chúng thích nghi với điều kiện nước chảy và chiếm ưu thế ở vùng cửa sông. Protozoa có thành phần loài khá đa dạng (5 - 14 loài), chủ yếu là các giống *Diffugia*, *Centropyxis*, *Tintinnidium*, *Tintinnopsis*, các giống loài thuộc Protozoa thường chỉ thị cho môi trường nước bị ô nhiễm bởi vật chất hữu cơ.

Trên sông nhánh, sự biến động số loài PSDV giữa các điểm thu tương đối thấp (24 - 36 loài) hơn so với sông chính (15 - 38 loài). Một số điểm thu có thành phần loài cao nhất như điểm 9, điểm 18 và điểm 19 và thấp nhất tại các điểm 4 và điểm 5 nhưng nhìn chung cấu trúc thành phần loài không có sự khác biệt lớn so với các điểm thu trên sông chính. Một số giống loài thường gặp trên sông Hậu như *Centropyxis aculeata*, *Centropyxis ecornis*, *Diffugia lebes* (Protozoa), *Brachionus angularis*,

Anuraeopsis fissa, *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus falcatus*, *Filinia terminalis*, *Polyarthra vulgaris*, *Philodina roseola* (Rotifera), *Bosmina longirostris*, *Bosminopsis deitersi* (Cladocera), *Eucyclops serrulatus*, *Mesocyclops leuckarti* và *Thermocyclops hyalinus* (Copepoda). Nhìn chung, có sự tương đồng khá cao về thành phần PSDV giữa sông chính và sông nhánh, chỉ số tương đồng Sorencen xác định được là 0,84. Chất lượng nước không có sự khác biệt lớn giữa sông chính và sông nhánh.



Hình 2.4. Thành phần phiêu sinh động vật tại các vị trí thu mẫu trên sông Hậu

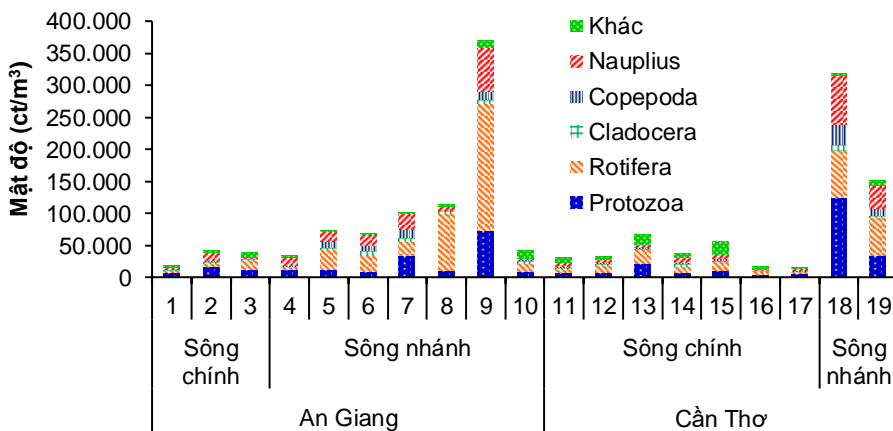
2.2.3. Mật độ phiêu sinh động vật trên sông Hậu

Mật độ PSDV trên sông Hậu có sự biến động khá cao giữa các điểm thu mẫu, trong đó các điểm thu trên sông nhánh có xu hướng đạt mật độ cao hơn sông chính. Mật độ PSDV tại các điểm thu mẫu biến động từ 15.538 - 370.003 ct/m³. Ở sông chính mật độ ghi nhận được khá thấp và biến động từ 15.358 - 66.618 ct/m³, trung bình 35.446 ± 16.572 ct/m³. Điểm thu ở Thuận Hưng có mật độ cao hơn các điểm thu khác, trong đó Protozoa và Rotifera có mật độ lần lượt là 21.529 ct/m³ và 22.412 ct/m³. Do đây là thủy vực bị ảnh hưởng bởi hoạt động nuôi trồng thủy sản trên sông như nuôi cá điêu hồng trong lồng - bè, nuôi cá Tra trong ao đất và nước thải sinh hoạt của các hộ dân sinh sống ven sông, hàm lượng TAN (0,368 mg/L) cao hơn so với các điểm thu khác trên sông chính, nên thuận lợi cho Protozoa và Rotifera phát triển.

Kết quả phân tích tương quan về thành phần phiêu sinh động vật cũng cho thấy TAN có mối tương quan thuận có ý nghĩa ($P < 0,5$) với Protozoa và Rotifera. Một số loài chiếm ưu thế *Tintinnopsis* sp. (3.529 ct/m^3), *Paramecium* sp. (2.647 ct/m^3), *Brachionus* sp. (6.176 ct/m^3), *Polyarthra vulgaris* (5.294 ct/m^3). Các điểm thu còn lại có mật độ PSDV thấp hơn và biến động từ $15.538 - 56.070 \text{ ct/m}^3$, một số giống loài chiếm ưu thế nhìn chung cũng tương tự như ở Thuận Hưng.

Trên sông nhánh, mật độ PSDV có xu hướng cao hơn các điểm thu trên sông chính và biến động từ $41.950 - 370.003 \text{ ct/m}^3$, trung bình $141.413 \pm 121.176 \text{ ct/m}^3$. Mật độ PSDV đạt cao nhất ở kênh Cái Sao 2 thuộc tỉnh An Giang và Thạnh Mỹ thuộc TP Cần Thơ. Các điểm thu có mật độ cao hơn 100.000 ct/m^3 như Thạnh Mỹ, Sông Cái Sắn, kênh Cái Sao 2, kênh Tây An và kênh Ông Cò thuộc sông nhánh. Trong đó, ngành Rotifera có mật độ trung bình cao hơn các nhóm khác ở phần lớn các điểm thu mẫu với các loài ưu thế như *Brachionus angularis*, *Filinia terminalis*, *Polyarthra vulgaris* (Rotifera). Đối với Protozoa và Copepoda thì loài *Diffugia lebes* và nhóm ấu trùng Nauplius của Copepoda cũng chiếm ưu thế ở hầu hết các thủy vực này. Riêng một số loài Cladocera như *Bosmina longirostris* thì chiếm ưu thế ở kênh Ông Cò (điểm 7), trong khi đó *Bosminopsis deitersi* chiếm ưu thế ở kênh Tây An. Mật độ PSDV đạt cao nhất ở kênh Cái Sao 2 (370.003 ct/m^3), trong đó Rotifera chiếm ưu thế với mật độ 198.059 ct/m^3 cho thấy môi trường nước có mức độ dinh dưỡng cao hơn (TAN = $1,5 \text{ mg/L}$) so với các điểm thu khác (TAN từ $0,005 - 1,4 \text{ mg/L}$). Các điểm thu còn lại có mật độ thấp hơn (từ $34.672 - 318.686 \text{ ct/m}^3$) nhưng nhìn chung về cấu trúc thành phần loài không có sự khác biệt lớn giữa các điểm thu mẫu.

Nhìn chung, mật độ PSDV ở khu vực sông Hậu có sự chênh lệch khá cao giữa các điểm thu mẫu và ở sông chính thì mật độ khá thấp hơn so với các điểm thu trên sông nhánh cho thấy mức độ ô nhiễm nước ở sông nhánh cao hơn sông chính.

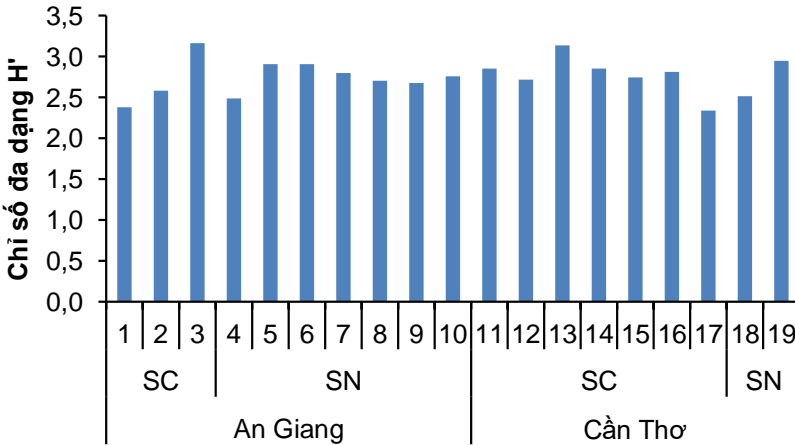


Hình 2.5. Biến động mật độ động vật nổi trên sông Hậu

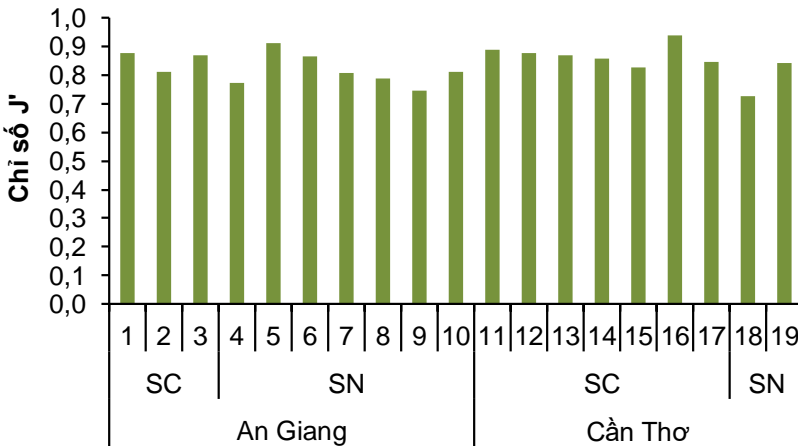
2.2.4. Đánh giá chất lượng nước trên sông Hậu sử dụng phiêu sinh động vật

Chỉ số đa dạng về thành phần phiêu sinh động vật trên sông Hậu biến động từ 2,3 - 3,2 cho thấy thành phần phiêu sinh động vật có tính đa dạng khá cao. Chỉ số H' không chỉ đánh giá được tính đa dạng thành phần loài phiêu sinh động vật mà còn có thể đánh giá được mức độ dinh dưỡng hay mức độ ô nhiễm của thủy vực. Chỉ số H' càng cao cho thấy tính đa dạng loài càng cao và mức độ ô nhiễm nước càng thấp. Theo Abbas and Talib (2018), các chỉ số đa dạng được sử dụng để mô tả và nghiên cứu thành phần của bất kỳ quần thể sinh vật nào trong môi trường thủy sinh, trong đó chỉ số đa dạng Shannon-Weiner được sử dụng phổ biến nhất thông qua việc xác định số loài và mật độ của các loài có trong mẫu thu. Trong nghiên cứu này, chỉ số H' trung bình trên sông chính và sông nhánh không có sự khác biệt đáng kể và biến động lần lượt từ $2,8 \pm 0,3$ và $2,7 \pm 2$ thể hiện chất lượng nước trên sông chính và sông nhánh là tương tự nhau. Ren et al. (2011) đã đánh giá phân mức chất lượng nước sử dụng PSDV làm sinh vật chỉ thị dựa vào chỉ số H' như sau: H' từ 0 - 1: ô nhiễm nặng; H' từ 1 - 2: ô nhiễm trung bình mức α ; H' từ 2 - 3 ô nhiễm trung bình mức β và $H' > 3$: ô nhiễm nhẹ hoặc không ô nhiễm. Dựa vào chỉ số đa dạng H' có thể đánh giá chất lượng nước ở vùng nghiên cứu từ ô nhiễm nhẹ đến ô nhiễm trung bình mức β , phân mức chất lượng nước tại các điểm thu mẫu được trình bày ở (Bảng 2.5). Chỉ số đồng đều J' ở khu vực nghiên cứu không có sự chênh lệch lớn

giữa các vị trí thu mẫu và biến động từ 0,73 - 0,91. Chỉ số đồng đều cho thấy mức độ phân bố của các cá thể giữa các loài trong quần xã sinh vật, chỉ số J càng cao các sinh vật phân bố càng đồng đều, mức độ ô nhiễm nước càng thấp và tính đa dạng thành phần loài càng cao.



Hình 2.6. Chỉ số đa dạng Shannon-Weiner (H')



Hình 2.7. Chỉ số đồng đều Pielou (J)

Để đánh giá mức độ dinh dưỡng của thủy vực, ngoài đánh giá chất lượng nước bằng các yếu tố lý, hóa học có thể dựa vào mật độ PSDV. Theo Zheng et al. (2007), có thể đánh giá mức độ dinh dưỡng của nước dựa vào tiêu chuẩn quốc tế, tác giả đã chia mức độ dinh dưỡng nước dựa vào mật độ PSDV như trình bày ở (Bảng 2.3). Trong nghiên cứu này mật độ PSDV biến động từ 15.538 - 370.003 ct/m³ cho thấy môi trường nước trên sông Hậu có mức độ dinh dưỡng thấp.

Bảng 2.5. Phân mức chất lượng nước tại các điểm thu mẫu trên sông Hậu

STT	Điểm thu	Sử dụng chỉ số H'	Dựa vào mật độ Zooplankton
1	Cồn Khánh Hòa	ONTB- β	DD thấp
2	Bến Phà Rạch Gọc	ONTB- β	DD thấp
3	Bến Phà Sơn Đốt	ON nhẹ	DD thấp
4	Vĩnh Ngươn	ONTB- β	DD thấp
5	Cầu Vĩnh Tre	ONTB- β	DD thấp
6	Cầu chữ S	ONTB- β	DD thấp
7	Kênh Ông Cò	ONTB- β	DD thấp
8	Kênh Tây An	ONTB- β	DD thấp
9	Kênh Cái Sao 2	ONTB- β	DD thấp
10	Kênh Cái Sao 1	ONTB- β	DD thấp
11	Bến phà Bò Ót	ONTB- β	DD thấp
12	Bến phà Trà Uối	ONTB- β	DD thấp
13	Thuận Hưng	ON nhẹ	DD thấp
14	Thới An	ONTB- β	DD thấp
15	Cồn Khương	ONTB- β	DD thấp
16	Cái Cui	ONTB- β	DD thấp
17	Cái Côn	ONTB- β	DD thấp
18	Thạnh Mỹ	ONTB- β	DD thấp
19	Sông Cái Sắn	ONTB- β	DD thấp

Ghi chú: ONTB- β : Ô nhiễm ở mức trung bình mức β ; ON nhẹ: Ô nhiễm nhẹ; DD thấp: dinh dưỡng thấp

2.2.5. Kết luận nghiên cứu điển hình

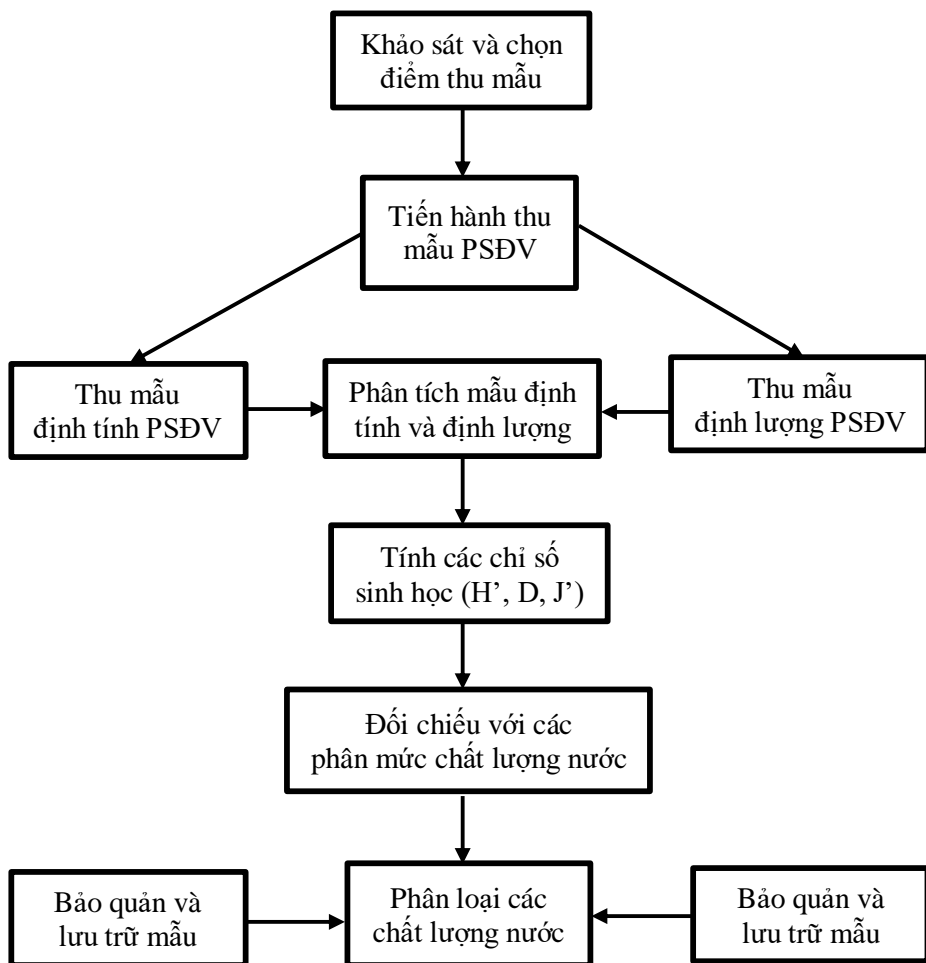
Nghiên cứu đã xác định được tổng cộng 106 loài phiêu sinh động vật ở khu vực sông Hậu, trong đó Rotifera có thành phần loài phong phú nhất với 39 loài (43%), kế đến là Protozoa (28 loài, 28%), các nhóm còn lại từ 10-14 loài (9-13%).

Thành phần loài và mật độ phiêu sinh động vật trên sông nhánh có xu hướng cao hơn ở các điểm thu trên sông chính. Mật độ của các nhóm Protozoa, Rotifera, Cladocera, Copepoda và Nauplius của Copepoda có mối tương quan có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) với hàm lượng TAN nhưng không có mối tương quan chặt chẽ với hàm lượng COD và PO_4^{3-} ở khu vực sông Hậu.

Mật độ phiêu sinh động vật biến động từ 15.538 - 370.003 ct/m³ cho thấy môi trường nước có mức độ dinh dưỡng thấp. Chỉ số H' biến động từ 2,3 - 3,2 thể hiện chất lượng nước ở khu vực nghiên cứu biến động từ ô nhiễm nhẹ đến ô nhiễm trung bình mức β .

2.3. TÓM TẮT QUI TRÌNH

Quy trình quan trắc sinh học sử dụng PSDV có thể được tóm tắt như sau:



2.4. KẾT LUẬN

Qui trình quan trắc sinh học sử dụng PSDV đã được hoàn thiện, triển khai ứng dụng hiệu quả ở vùng NTTS nước ngọt trên sông Hậu và nước lợ - mặn thuộc các tỉnh Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau. Qui trình này có thể được ứng dụng rộng rãi trong quan trắc chất lượng nước trong cùng điều kiện sinh thái ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

QUI TRÌNH 3

SỬ DỤNG KỸ THUẬT GIS TRONG BẢN ĐỒ HÓA CHẤT LƯỢNG NƯỚC

3.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

3.1.1. Giới thiệu

Quan trắc chất lượng nước trong nuôi trồng thủy sản (NTTS) là nhằm theo dõi diễn biến các thông số môi trường ở vùng nuôi. Việc quan trắc sẽ được thực hiện ở nhiều điểm tại nhiều địa phương ở các thời điểm khác nhau, vì vậy kết quả quan trắc sẽ có rất nhiều thông số môi trường nước. Thông thường các kết quả này được thống kê thành bảng số liệu hoặc đồ thị, nhưng cả 2 hình thức này người đọc đều khó theo dõi. Ví dụ với việc thu mẫu hàng chục đến hàng trăm điểm với ký hiệu các điểm A, B, C... tại hàng chục địa bàn với các ký hiệu xã X, Y, Z... nhưng bảng số liệu hay đồ thị chỉ được mô tả tên địa danh, không thể hiện các điểm, xã này ở đâu, làm người đọc rất khó hình dung ra được vị trí của các giá trị này ở đâu trên bản đồ. Do đó cần tích hợp kết quả đo được lên từng điểm, từng vùng cụ thể trên bản đồ khu vực, tỉnh, huyện hay quốc gia để người đọc cảm nhận được giá trị quan trắc như tính liên kết (gần/xa về mặt địa lý) và các yếu tố xung quanh có thể có ảnh hưởng đến kết quả quan trắc. Vì vậy việc thể hiện kết quả bằng trực giác theo kích cỡ (cao/thấp, lớn/nhỏ) hay màu sắc khác nhau lên bản đồ là cần thiết để người dùng dễ cảm nhận, kỹ thuật này gọi là GIS. Có nhiều định nghĩa khác nhau về GIS, điểm chung là hệ thống thông tin địa lý có các thuộc tính được xác định như đường, điểm, vùng. Là công cụ để lưu trữ và truy vấn, rút trích, tính toán, biến đổi và hiển thị dữ liệu không gian thông qua bản đồ từ thế giới thực cho những mục tiêu khác nhau của người dùng.

3.1.2. Cơ sở khoa học phát triển qui trình

GIS ra đời từ thập niên 60, đã được ứng dụng trong thủy sản từ những năm 1980 chủ yếu là trong quản lý nguồn lợi, khai thác thủy sản, hỗ trợ trong việc quản lý phân bố, mật độ loài trong bảo tồn đa dạng sinh học. Đầu thập kỷ 90, GIS được ứng dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy

sản (NTTS). GIS không những hỗ trợ quản lý dữ liệu về môi trường, vùng nuôi, đối tượng nuôi mà còn cả thông tin địa lý về thị trường và kênh phân phối sản phẩm.

Việc ứng dụng GIS trong NTTS mang lại tiện ích trong phân tích và trình bày kết quả từ cơ sở dữ liệu, khả năng biểu diễn mối tương quan giữa các yếu tố thủy lý, thủy hóa và sinh học trong môi trường nước. GIS có khả năng hỗ trợ người dùng trong quản lý, lập ra kế hoạch, ra quyết định việc kiểm soát môi trường và các hoạt động NTTS.

Việc lập bản đồ chất lượng nước giúp người dùng xác định được bức tranh toàn cảnh về hiện trạng môi trường, điểm, diện tích vùng, nơi có kết quả bất thường, theo dõi diễn biến, xu hướng biến động, giúp người dùng xác định nguyên nhân và giải pháp nhanh chóng từ góc độ địa lý, làm cơ sở để quản lý vùng nuôi thủy sản hợp lý hơn. Khi kết quả quan trắc của từng yếu tố môi trường thể hiện lên bản đồ người dùng có thể xác định NTTS bị tác động bởi môi trường xung quanh hay NTTS tác động đến khu vực thông qua các giá trị đo đạc của từng điểm ở khu vực trên bản đồ và tìm mối liên hệ giữa chúng.

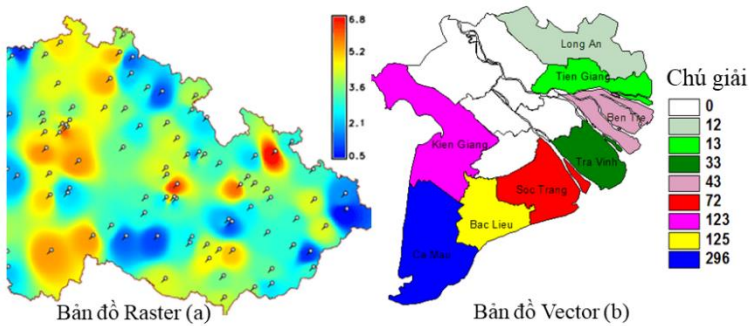
Vì vậy sử dụng kỹ thuật GIS trong thiết lập bản đồ chất lượng nước cho vùng nuôi thủy sản ĐBSCL là cần thiết nhằm đánh giá chất lượng nước một cách tổng quát, nguồn nước, để quản lý môi trường tốt hơn cho NTTS ở từng khu vực ở mỗi địa phương.

3.1.2.1. Sơ lược về GIS và bản đồ

GIS là một công cụ tập hợp những qui trình dựa trên máy tính để lập bản đồ, lưu trữ và thao tác dữ liệu địa lý, phân tích các sự vật hiện tượng thực trên trái đất, dự đoán tác động và hoạch định chiến lược, bao gồm phần cứng, phần mềm, cơ sở dữ liệu và người dùng. GIS được thiết kế để thu nhận, lưu trữ, cập nhật, phân tích, xử lý dữ liệu và hiển thị kết quả lên bản đồ nhằm giải quyết các vấn đề theo nhu cầu người dùng.

GIS lưu giữ thông tin dưới dạng tập hợp các lớp thuộc tính, chúng liên kết với nhau nhờ các đặc điểm địa lý hệ tọa độ. Hệ thống GIS làm việc với hai dạng mô hình dữ liệu địa lý khác nhau – mô hình vector và mô hình raster (Hình 3.1). Trong mô hình vector, thông tin về điểm,

đường và vùng được mã hoá và lưu dưới dạng tập hợp các tọa độ x, y. Vị trí của đối tượng điểm cụ thể có thể được biểu diễn bởi một tọa độ đơn x và y, còn các đối tượng dạng đường, như kênh rạch, sông suối, có thể được lưu dưới dạng tập hợp các tọa độ điểm. Đối tượng dạng vùng như khu vực nuôi trồng thủy sản, quận huyện, khu bảo tồn, khu nông nghiệp, khu rừng... được lưu như một vòng khép kín của các điểm tọa độ. Mô hình vector rất hữu ích đối với việc mô tả các đối tượng riêng biệt.



Hình 3.1. Tính liên tục của bản đồ raster và tính rời rạc của bản đồ vector

Mô hình raster được phát triển cho mô phỏng các đối tượng liên tục trong miêu tả các đối tượng có sự chuyển đổi liên tục như độ sâu lòng sông, mức độ ô nhiễm từ nhiều đến ít trong vùng, mật độ loài. Một ảnh raster là một tập hợp các ô lưới, cả mô hình vector và raster đều được dùng để lưu dữ liệu địa lý với những ưu điểm, nhược điểm riêng. Các hệ GIS hiện đại có khả năng quản lý cả hai mô hình này.

3.1.2.2. Một số lý do làm cho GIS chưa phổ biến trong lĩnh vực thủy sản và môi trường

Mặc dù hiệu quả của việc ứng dụng GIS trong quản lý môi trường, thủy sản và quản lý tài nguyên thiên nhiên đã rõ, tuy nhiên có nhiều nguyên nhân làm cho việc ứng dụng GIS ở ĐBSCL và cả nước còn hạn chế, trong đó có thể có 2 nguyên nhân chính:

(i) Chi phí mua bản quyền phần mềm cao, đa số phần mềm GIS là phần mềm thương mại, làm hạn chế người sử dụng, do kỹ thuật viên trong lĩnh vực thủy sản, là chuyên ngành sinh học, môi trường. Trong

khi GIS là khoa học máy tính và tin học ứng dụng, do đó người làm công việc trong sinh học rất ngại theo đuổi GIS, thay vì tập trung vào chuyên môn về môi trường hay thủy sản đã được đào tạo, khả năng và kiến thức tin học của họ cũng hạn chế hơn kỹ thuật viên khoa học máy tính thực thụ. Ngoài ra, cơ quan quản lý cũng không sẵn lòng chi khoản tiền lớn mua phần mềm, nhiều người vẫn cho rằng GIS cũng là công cụ hỗ trợ, trong khi lợi ích chưa rõ, chưa có người sử dụng, cần nhắc việc bố trí người chuyên trách, họ sẽ thuê mượn các dịch vụ GIS khi thật sự cần thiết vào một thời điểm cụ thể nào đó, như quy hoạch tổng thể.

(ii) Trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam hay ĐBSCL, đa số nuôi quy mô nhỏ lẻ ở mức độ nông hộ, mặc dù là liền kề nhau nhưng thật sự là cách biệt và rời rạc giữa các hộ nuôi, mỗi hộ tự quản lý và vận hành độc lập về kỹ thuật (ví dụ: 2 ao nuôi liền kề nhưng đối tượng nuôi và môi trường nuôi 2 ao hoàn toàn độc lập và không phụ thuộc lẫn nhau, do đó khi quan trắc môi trường ao này thì không thể suy luận ra ao bên cạnh). Trong thực tế không thể quan trắc từng ao, mà chỉ quan trắc mang tính đại diện, do đó GIS khó thể dự đoán chính xác trong trường hợp này, nếu quan trắc số lượng mẫu ít (vài hộ) sẽ không có ý nghĩa khi tích hợp lên bản đồ.

Trong thực tế GIS thường được áp dụng trong quản lý mang tính khu vực với môi trường và sinh cảnh khác nhau, các loại hình sinh thái phải liên thông, có tác động/bị tác động bởi nhiều yếu tố bên ngoài theo không gian và thời gian, khu vực phải là một phức hợp liên thông nơi có dòng chảy mạnh/yếu; sông rộng/hẹp; sông sâu/cạn; gần/xa khu công nghiệp; gần/xa khu nông nghiệp, nơi tập trung NTTS hay khu dân cư trên diện tích lớn như trên mạng lưới sông, rạch, vùng nuôi, ngư trường, đồng ruộng, rừng hay biển.

3.1.3. Quan trắc môi trường

Là công tác thu thập mẫu chất lượng môi trường, trước khi quan trắc môi trường nước cần xác định rõ ràng các thông tin và số liệu cần thu thập, cần chọn các điểm thu mẫu đại diện khu vực, phù hợp với nội dung và mục tiêu nghiên cứu để đưa ra các quyết định và kết luận khách quan.

Các dụng cụ và vật liệu nghiên cứu chính bao gồm: Máy đo đa chỉ tiêu Hanna, nhiệt kế, khúc xạ kế, thùng trữ lạnh, chai 1 lít, chai nút mài nâu 125 mL, lọ nút mài trắng 125 mL, xô nhựa, ca nhựa, $MnSO_4$ và $KI-NaOH$, dd H_2SO_4 , tại mỗi điểm phải lưu trí tọa độ của từng điểm bằng thiết bị định vị GPS để đưa lên bản đồ sau này.

Tùy theo mục tiêu nghiên cứu, mẫu môi trường nước có thể thu mẫu với định kỳ hằng ngày, 3 ngày/lần, 1 tuần/lần, 2 tuần/lần, 3 tuần/lần, 1 tháng/lần, 2 tháng/lần hoặc 3 tháng/lần nhưng không ít hơn 2 lần/năm.

3.1.3.1. Đối với chỉ tiêu đo trực tiếp

Các yếu tố thủy lý, hóa: Nhiệt độ, pH, độ mặn được đo trực tiếp bằng thiết bị cầm tay như nhiệt kế, khúc xạ kế hoặc máy đo đa chỉ tiêu Hanna.

3.1.3.2. Đối với chỉ tiêu phân tích ở phòng thí nghiệm

Một số chỉ tiêu phải phân tích ở phòng thí nghiệm thì phải thu, bảo quản và vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích, phải theo quy chuẩn phân tích cho từng loại chỉ tiêu.



Hình 3.2. Quan trắc tại hiện trường (a) và (b), thu mẫu về phân tích ở phòng thí nghiệm (c) và phương pháp phân tích mẫu (d)

Phương pháp phân tích dựa theo chuẩn APHA (2017) bảng 3.1:

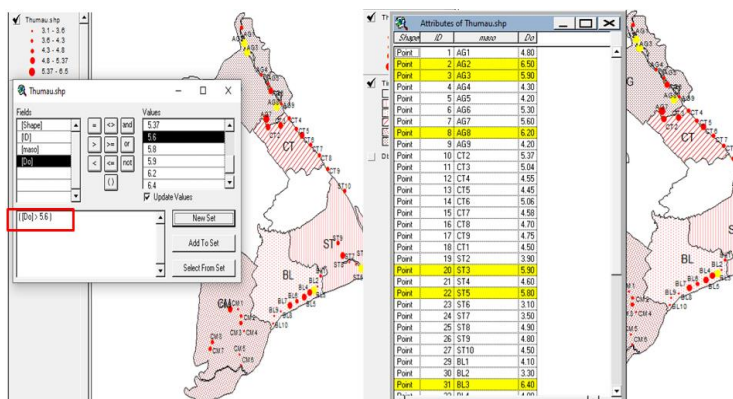
Bảng 3.1. Phương pháp thu, bảo quản và phân tích mẫu

Chỉ tiêu	Dụng cụ	Phương pháp thu mẫu	Phương pháp phân tích
Nhiệt độ	Máy đo	Đo trực tiếp	Máy đo đa chỉ tiêu HANNA
pH		Đo trực tiếp	
Độ mặn		Đo trực tiếp	
DO	Chai nút mài nâu	MnSO ₄ và KI-NaOH	Winkler, 4500-O-C (APHA, 2017)
TSS	Chai 1 lít	Trữ lạnh (4°C)	PP Trọng lượng (2540-D, TSS) (APHA, 2017)
Độ kiềm	Chai 1 lít	Trữ lạnh (4°C)	Trung hòa axit, 2320-B (APHA, 2017)
BOD ₅	Chai nút mài nâu	MnSO ₄ và KI-NaOH	Winkler, 5210-B (APHA, 2017)
COD	Chai nút mài trắng	Cố định dd H ₂ SO ₄	Hoàn lưu kín, 5220-C (APHA, 2017).
TAN	Chai 1 lít	Trữ lạnh (4°C)	Phenate, 4500-B (APHA, 2017)
NO ₂ ⁻	Chai 1 lít	Trữ lạnh (4°C)	Diazonium, 4500-B (APHA, 2017)
H ₂ S	Chai nút mài nâu	Trữ lạnh (4°C)	Methylene Blue, 4500-D (APHA, 2017)
PO ₄ ³⁻	Chai 1 lít	Trữ lạnh (4°C)	SnCl ₂ 4500-P-D (APHA, 2017)

3.1.4. Ưu điểm và nhược điểm của qui trình

3.1.4.1. Ưu điểm

Qui trình đơn giản, phần mềm miễn phí, dễ sử dụng mang tính đại chúng cao, người dùng không nhất thiết phải là kỹ thuật viên chuyên nghiệp, chuyên gia về GIS hay công nghệ thông tin. Thông tin được cập nhật và chia sẻ dễ dàng, việc tạo bản đồ nhanh chóng theo yêu cầu người dùng. Số liệu được thể hiện không gian sinh động dễ theo dõi, giám sát và quản lý, truy vấn tìm các giá trị theo nhu cầu người dùng. Ví dụ truy vấn tìm những điểm có oxy hòa tan lớn hơn 5,6 mg/L, thì chương trình sẽ xác định những điểm theo điều kiện đó và tự động tô màu vàng (Hình 3.3)



Hình 3.3. Truy vấn tìm giá trị theo nhu cầu người dùng

3.1.4.2. Nhược điểm

Chỉ áp dụng giải quyết các vấn đề đơn giản trong đánh giá chất lượng nước và các thuộc tính khác.

Chưa giải quyết được các mô hình dự đoán phức tạp, phải cần đến phần mềm thương mại, cần thuật toán chuyên môn, các thao tác phức tạp, cần các thuật toán lập trình theo ngôn ngữ máy tính, người dùng phải được đào tạo bài bản và mang tính chuyên nghiệp, trang thiết bị cần đầu tư tương xứng, máy tính cấu hình đủ mạnh cho đồ họa.

3.1.5. Phương pháp sử dụng kỹ thuật GIS trong thiết lập bản đồ hóa chất lượng nước

3.1.5.1. Đưa hệ tọa độ vào Google Earth Pro

Trong quá trình thu mẫu thì định vị các vị trí thu mẫu bằng thiết bị định vị GPS với các tọa độ vĩ độ và kinh độ, Vĩ độ: Chữ N có nghĩa là vĩ độ Bắc (North), nằm trên đường xích đạo (Bắc bán cầu), nếu nó có chữ S thì có nghĩa là nó nằm ở bán cầu Nam (dưới đường xích đạo).

Trong trường hợp kinh độ, chúng sẽ có E (East: hướng Đông) hoặc W (West: phía Tây), tùy thuộc vào việc chúng nằm ở phía Đông hay phía Tây của kinh tuyến Greenwich

Ví dụ: điểm A có Kinh độ 105°12'13"E (nằm ở phía Đông) và Vĩ độ 9°08'12"N (nằm ở Bắc bán cầu)

Giá trị này sẽ được đổi sang đơn vị radian, tức là đồng nhất các giá trị độ, phút, giây, thành 1 đơn vị duy số là số thập phân, là đơn vị chia nhỏ nhất vị trí cụ thể của điểm trên mặt đất (Bảng 3.2).

$$\text{Kinh độ: } 105 + \frac{12}{60} + \frac{13}{3600} = 105,2036$$

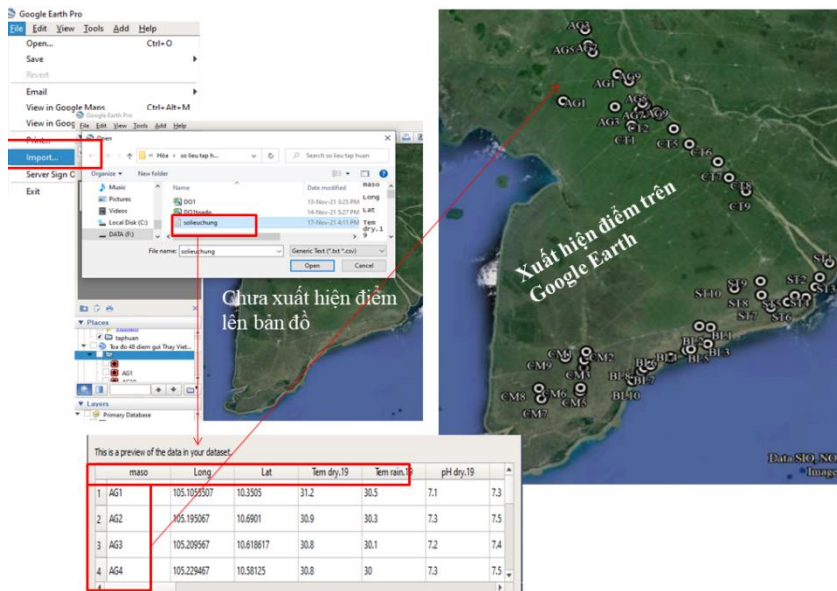
$$\text{Vĩ độ: } 9 + \frac{8}{60} + \frac{12}{3600} = 9,136666667$$

I	Sóc Trăng	Code	Độ, Phút, Giây		Radian		Mã số
			Vĩ độ (N)	Kinh độ (E)	Vĩ độ (N)	Kinh độ (E)	
1	Vàm Ông Tám-CLD	ST1	09°35'33.17"	106°15'35.84"	106.259956	9.592547	ST1
2	Bến đò Nông Trường-CLD	ST2	09°31'28.51"	106°13'10.31"	106.219531	9.524586	ST2
3	Tầm Vu-Trần Đề	ST3	09°28'50.19"	106°12'4.55"	106.201264	9.480608	ST3
4	6 Quê 1-Trần Đề	ST4	09°25'44.04"	106°9'37.21"	106.160336	9.428900	ST4
5	Xã Mách-Trần Đề	ST5	09°26'16.32"	106°6'49.00"	106.113611	9.437867	ST5
6	Đầu Vàm Trà Niên-Vĩnh Châu	ST6	09°24'26.7"	106°4'59.2"	106.083111	9.407417	ST6
7	Cầu Trà Niên-Vĩnh Châu	ST7	09°22'51.9"	106°0'39.3"	106.010917	9.381083	ST7
8	Hòa Lý-Mỹ Xuyên	ST8	09°26'21.91"	105°58'12.94"	105.970261	9.439419	ST8
9	Bến phà Dù Tho-Mỹ Xuyên	ST9	09°30'17.72"	105°57'56.33"	105.965647	9.504922	ST9
10	Chàng Rê-Mỹ Xuyên	ST10	09°28'13.026"	105°51'13.00"	105.853611	9.470285	ST10
II Bạc Liêu							
11	Kênh Rạch Thằng	BL1	09°17.096'	105°45.145'	105.752417	9.284930	BL1
12	Kênh Chùa Ông Bón	BL2	09°17.422'	105°42.266'	105.704433	9.290370	BL2
13	Cửa biển Nhà Mát	BL3	09°12.386'	105°44.468'	105.741133	9.206430	BL3
14	Kênh Chùa Phật	BL4	09°10.867'	105°40.162'	105.669367	9.181120	BL4
15	Kênh Mưemo 1	RI.5	09°10.517'	105°39.138'	105.657300	9.175280	RI.5

Bảng 3.2. Chuyển đơn vị tọa độ sang dạng thập phân radian

Dùng hệ radian để đưa Bảng 3.2 lên Google Earth, nội dung bảng này bao gồm số liệu từ quan trắc là có nhiều cột và nhiều dòng, có mã số của các điểm quan trắc, thời gian quan trắc và được lưu dưới dạng Excel.csv. Tích hợp giá trị này sẽ có nhiều lựa chọn, chẳng hạn như thể hiện mã số điểm thu lên tọa độ của Google Earth, hoặc hiện 1 giá trị cụ thể nào đó cho từng thuộc tính tương ứng với 1 bản đồ.

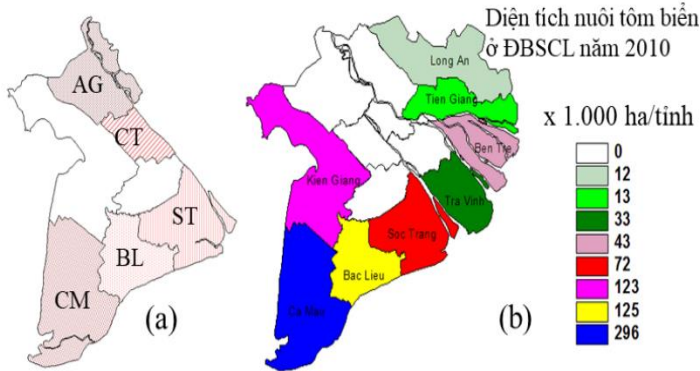
Cách đưa dữ liệu lên Google Earth ở (Hình 3.4). Ban đầu trên Google chưa xuất hiện các mã số điểm quan trắc (AG1, AG2,... CT1, CT2..CM8, CM9), sau khi đưa Bảng 3.2 vào thì tọa độ vào thì trên Google sẽ xuất hiện các điểm quan trắc.



Hình 3.4. Đưa bản số liệu từ quan trắc trong đó có tọa độ đã chuyển và mã số điểm thu lên Google Earth

Vậy là vị trí tọa độ đã được đưa lên Google Earth, trong trường cần xác định các vùng riêng biệt thuộc đơn vị hành chính thì thêm lớp vùng (polygon) như trong nghiên cứu này cần xác định tỉnh này tỉnh khác, để dễ nhận biết điểm này thuộc tỉnh nào. Trong Google Earth là ảnh vệ tinh nên không phân biệt ranh giới giữa các tỉnh, do đó cần 1 bản đồ hành chính có các ranh giới này, cùng tỷ lệ với bản đồ từ vệ tinh để chuyển các tọa độ từ bản đồ vệ tinh sang bản đồ hành chính và số hóa 2 lớp trên bản đồ hành chính là lớp điểm thu mẫu và lớp tỉnh (để xác định ranh giới

tỉnh). Trong trường hợp này, chỉ cần xác định ranh giới nên giá trị thuộc tính của lớp tỉnh là không quan trọng, chỉ biết là chúng khác nhau qua màu sắc, kiểu sọc, chấm... hình 3.5a.



Hình 3.5. Xác định ranh giới các tỉnh (a), xác định diện tích nuôi tôm ven biển các tỉnh ĐBSCL 2020 (b)

Tuy nhiên, trong trường hợp xác định diện tích nuôi của tỉnh thì tích hợp giá trị diện tích, sẽ tương ứng với các màu khác nhau, ví dụ màu đậm thể hiện diện tích lớn, màu nhạt thể hiện diện tích nhỏ và tương ứng với từng giá trị cụ thể trong chú giải của bản đồ (Hình 3.5b). Ngoài ra, trong trường hợp không cần xác định đơn vị hành chính từng vùng riêng biệt nghiên cứu trên biển, trong 1 khu rùng thì không cần lớp này và chỉ xác định tọa độ điểm.

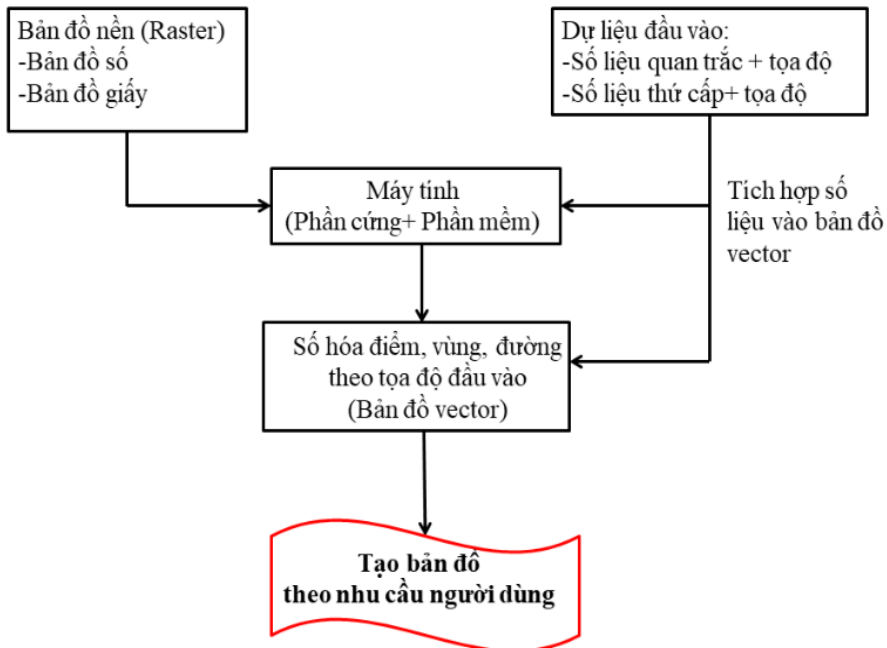
3.1.5.2. Số hóa vùng nghiên cứu từ bản đồ nền

a. Cơ sở dữ liệu GIS

Cơ sở dữ liệu là dữ liệu đầu vào cần thiết để phân tích, dự đoán, xử lý, rút trích, chúng có thể là dữ liệu thuộc tính và dữ liệu không gian, trong đó dữ liệu thuộc tính gồm:

- Số liệu sơ cấp: quan trắc, khảo sát.
- Số liệu thứ cấp: số liệu thống kê, số liệu tổng hợp từ các nguồn khác nhau.

Dữ liệu không gian là bản đồ nền, chúng có thể là bản đồ xuất bản dạng giấy, bản đồ số, ảnh vệ tinh hình 3.6.

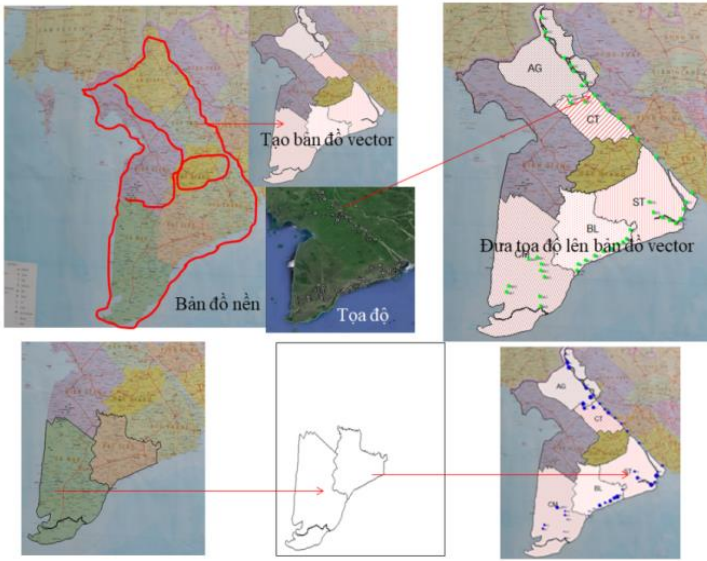


Hình 3.6. Sơ đồ cách thực hiện tạo bản đồ

Bản đồ nền là bản đồ chi bao gồm yếu tố nền cơ sở địa lý, địa danh để làm cơ sở thể hiện các nội dung khác trên bản đồ làm cơ sở để xác định vị trí địa lý của các đối tượng của từng thuộc tính để tích hợp dữ liệu lên đó theo nhu cầu người dùng (Hình 3.7), có thể là bản đồ hành chính, bản đồ sông ngòi, bản đồ sử dụng đất, bản đồ dân cư.

Ví dụ: Dùng bản đồ hành chính ĐBSCL để xác định địa giới hành chính của các tỉnh, bản đồ sông ngòi thì xác định hệ thống sông rạch của khu vực đó, bản đồ nền sẽ được số hóa lại thành bản đồ vector (Hình 3.7) và cập nhật lại theo tình hình mới như nhập/tách địa phương, thay đổi sử dụng đất, khi thể giới thật khác với bản đồ nền, còn các thuộc tính khác như nhiệt độ, oxy hòa tan là từ kết quả quan trắc tích hợp lên các vị trí quan trắc trên bản đồ vector này tạo bản đồ mới theo nhu cầu người dùng.

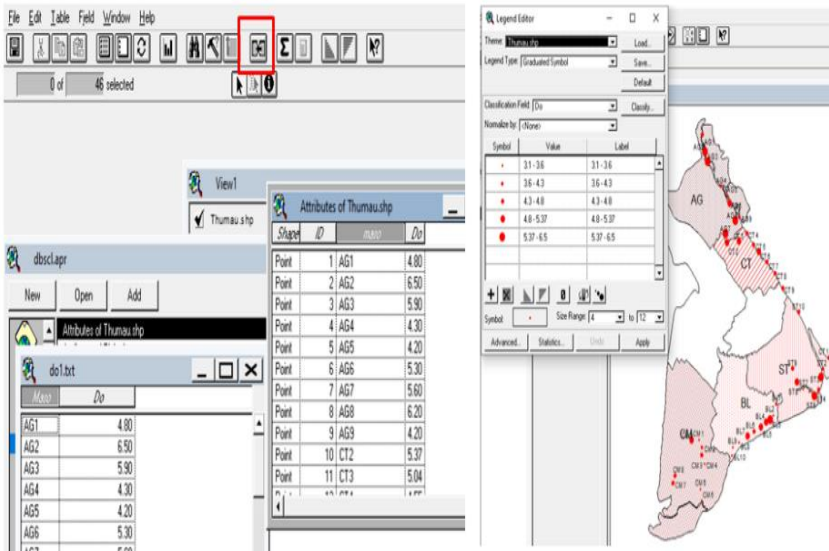
Phần mềm Arcview GIS phiên bản miễn phí sẽ áp dụng để số hóa bản đồ nền (raster) thành bản đồ vector.



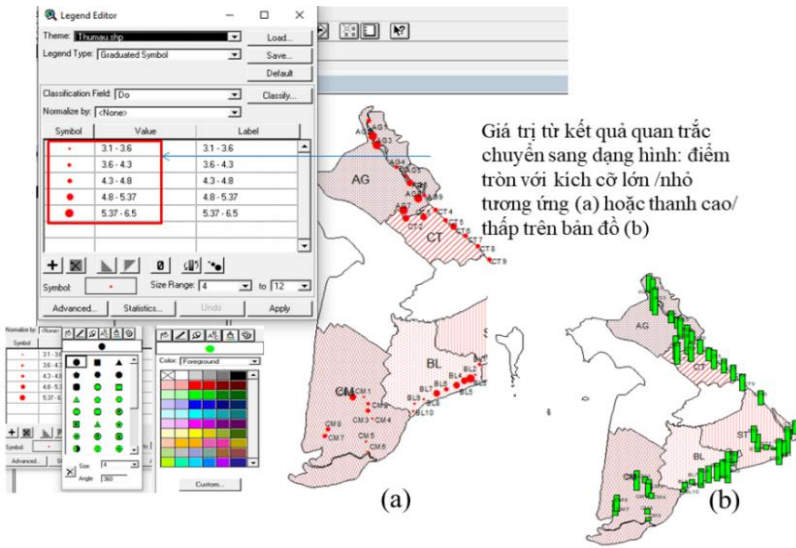
Hình 3.7. Cách tạo bản đồ chất lượng nước theo nhu cầu người dùng

b. Tích hợp kết quả phân tích với bản đồ nền tạo bản đồ thuộc tính

Cơ sở dữ liệu từ quan trắc sẽ lưu trữ trên file Microsoft Excel và với mã số của các điểm thu mẫu, vùng, điểm sẽ được kết nối với phần mềm “Join” để dàng và truy xuất kết quả nhanh và thuận tiện (Hình 3.8).

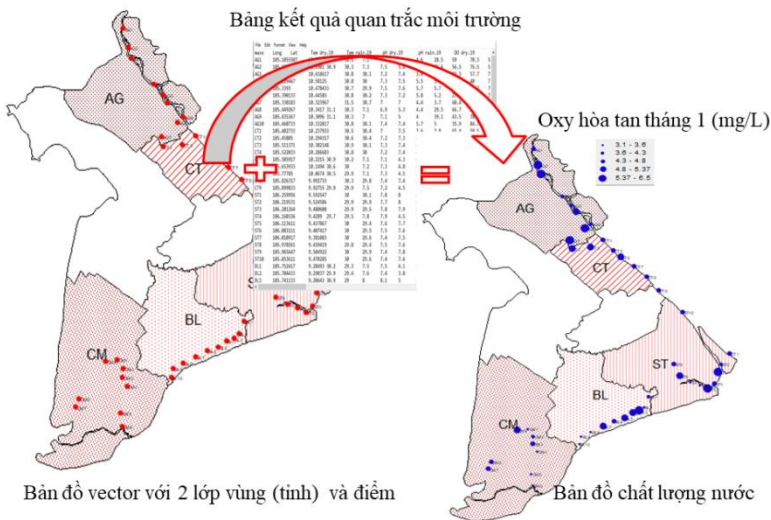


Hình 3.8. Kết nối cơ sở dữ liệu lưu trên file excel với phần mềm



Hình 3.9. Bản đồ có thể trang trí bằng nhiều dạng khác nhau dạng điểm (a) hoặc dạng thanh đồ thị (b) theo nhu cầu người dùng

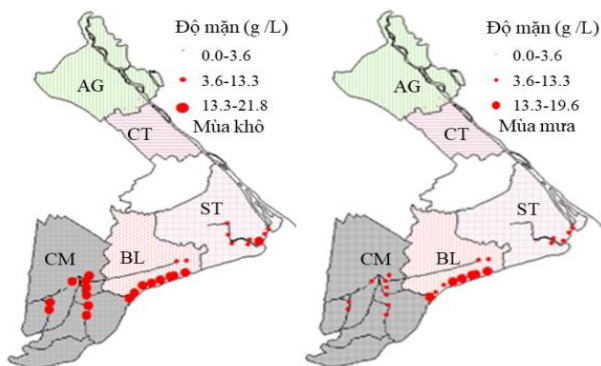
Từ cơ sở dữ liệu lưu trên file excel có thể kết nối với phần mềm và tạo bản đồ thuộc tính nhanh cho bất cứ thông số môi trường nào từ bảng Excel; ví dụ, từ các tọa độ định vị ban đầu kết nối dữ liệu tạo bản đồ thuộc tính oxy hòa tan mg/L tháng 1 tại các điểm thu mẫu ở các tỉnh ĐBSCL (Hình 3.10).



Hình 3.10. Tích hợp kết quả quan trắc lên bản đồ

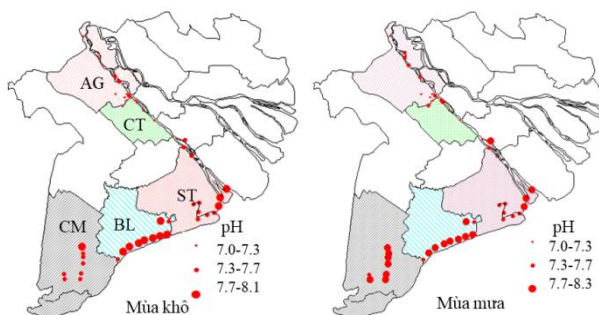
3.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

Kết quả quan trắc cho thấy độ mặn ở vùng AG và CT độ mặn bằng 0 ở mùa mưa và mùa khô, trong khi các tỉnh ven biển ST, BL và CM thì độ mặn mùa mưa thấp hơn mùa khô ở vùng cửa sông và nơi xa bờ biển, không có sự khác biệt về độ mặn ở các điểm ven biển ở 2 mùa (Hình 3.11).



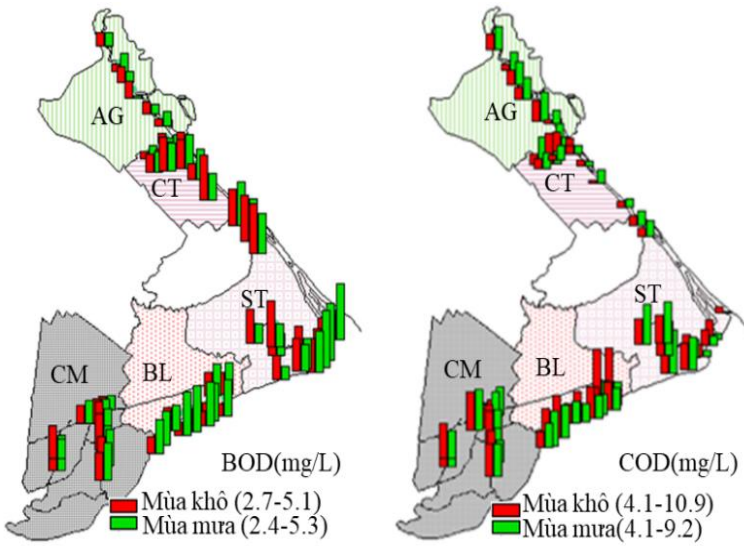
Hình 3.11. Độ mặn ở mùa khô và mùa mưa

pH ở vùng ven biển cao hơn vùng nước ngọt, một số địa điểm ở CM, pH mùa mưa cao hơn ở mùa khô, các địa phương còn lại không có sự khác biệt nhiều về pH ở 2 mùa (Hình 3.12).



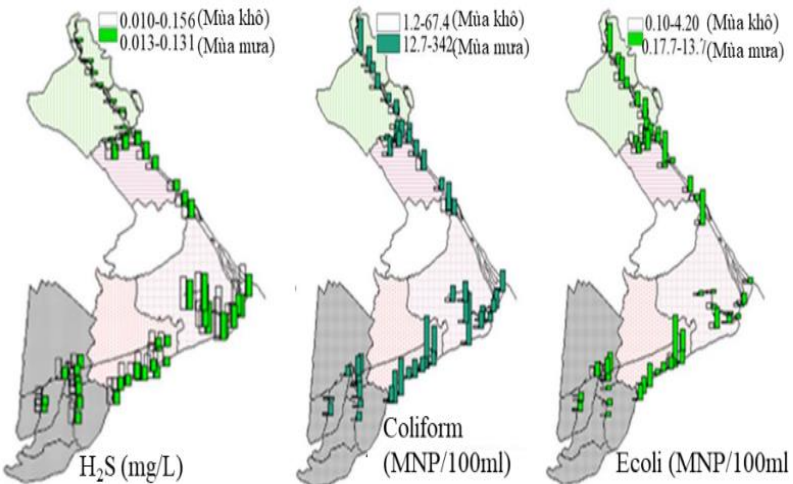
Hình 3.12. pH ở mùa khô và mùa mưa

BOD ở AG thấp hơn so với các địa phương khác, vùng ST và BL thì BOD cao hơn mùa khô, tuy nhiên khu vực xa biển trên sông Mỹ Thanh thì ngược lại vùng này có BOD mùa khô cao hơn mùa mưa. Ngoài ra, vùng CT và CM thì khác biệt không rõ ràng giữa 2 mùa. Trong khi đó COD ở các tỉnh ven biển cao hơn các tỉnh nước ngọt, CT có COD thấp nhất, tùy theo từng địa điểm cụ thể COD không có tính quy luật cụ thể giữa 2 mùa (Hình 3.13).



Hình 3.13. BOD và COD ở mùa khô và mùa mưa

H₂S ở AG thấp nhất và cao nhất ở ST. sự khác biệt giữa 2 mùa là chưa rõ, và Coliform ở tỉnh ven biển cao hơn vùng nước ngọt và cao nhất là vùng ven biển ST, BL. Tương tự, E. coli trong mùa mưa cao hơn mùa khô, không có sự khác biệt về 2 vùng sinh thái nước mặn và nước ngọt, Ecoli thấp nhất là ở ST.



Hình 3.14. H₂S, Coliform và Ecoli ở mùa khô và mùa mưa

3.3. ỨNG DỤNG CỦA GIS

Vì GIS được thiết kế như một hệ thống chung để quản lý dữ liệu không gian, nó có rất nhiều ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như trong phát triển quy hoạch sử dụng đất, quản lý tài nguyên thiên nhiên, đa dạng sinh học, mật độ, phân bố thành phần loài, trong nuôi trồng thủy sản GIS ứng dụng trong quản lý vùng nuôi, môi trường, tối ưu hóa trong kênh phân phối của đại lý trong lưu thông hòa hóa và tiếp cận thị trường.

3.4. KẾT LUẬN

Quy trình sử dụng kỹ thuật GIS trong thiết lập bản đồ hóa chất lượng nước là quy trình đơn giản dễ thực hiện, với phần mềm miễn phí, rất hiệu quả cho cán bộ quản lý cơ sở trong việc thu thập thông tin, cập nhật chia sẻ và theo dõi môi trường ở vùng khu vực mình quản lý.

QUI TRÌNH 4

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN CHUYỂN HÓA ĐẠM TRONG BÙN ĐÁY AO CHO XỬ LÝ NƯỚC NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

4.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

4.1.1. Trang thiết bị cần thiết

Tủ cấy vô trùng (Astec, Anh, Model 50546), tủ ủ (Sanyo, Nhật, Mir 262), tủ đông sâu (-86°C, MDF-U52V), tủ mát (Alaska), nồi hấp tiệt trùng (HVE 50, Nhật), tủ sấy (Mettler, Đức), cân điện tử (Sartorius, Đức, GM 612), kính hiển vi Olympus CX21 (Olympus Optical Co. Ltd., Nhật), máy khuấy từ gia nhiệt HP-3000 (Lab Companion, Hàn Quốc), máy so màu (9423 UVA 1002E, Helios Alpha, England). Micropipete các loại (Đức, Lab System).

4.1.2. Thu mẫu và xử lý mẫu

Mẫu bùn ao tôm được thu bằng bộ dụng cụ PVC (đường kính 49 mm) theo thiết kế của Somsiri et al. (2006) có cải tiến. Bùn đáy ao thu bằng dụng cụ ống PVC được loại bỏ nước thông qua các lỗ trên thân ống, sau đó lớp bùn trên mặt có độ dày 2 - 5 cm được thu vào túi nhựa. Mẫu bùn được thu 4 - 5 điểm xung quanh ao, sau đó trộn đều các mẫu lại với nhau để đồng nhất mẫu và bảo quản trong thùng lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành xử lý và phân lập.



Hình 4.1. Dụng cụ thu mẫu bùn đáy ao nuôi tôm

4.1.3. Phân lập và nuôi cấy sinh vi khuẩn trên môi trường thạch

Phương pháp phân lập và nuôi cấy sinh vi khuẩn từ mẫu bùn gồm các bước như sau: cho 1g mẫu bùn vào 20 mL môi trường AOB (bổ sung 1% NaCl) gồm 0,1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 13,5g Na_2HPO_4 ; 0,7g KH_2PO_4 ; 0,01g $FeCl_3$; 0,18g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,5g $NaHCO_3$; 0,5g $(NH_4)_2SO_4$ và 1.000 mL nước cất (Spieck & Bock, 2005). Môi trường được chuẩn bị trong bình 100 mL và nuôi ở 28°C trên máy lắc với vận tốc 160 rpm (vòng/phút) trong điều kiện che tối để nuôi cấy sinh mật độ vi khuẩn oxy hóa đạm ammonia trước khi phân lập. Sau 7 ngày nuôi, tiến hành pha loãng mẫu và phân lập vi khuẩn trên môi trường AOB (bổ sung 1% NaCl và 1,5% Agar), ủ 28°C trong 7 ngày, chọn khuẩn lạc đơn có hình dạng và màu sắc khác nhau để tách riêng đến khi đạt được khuẩn lạc đơn và đồng nhất về mặt hình thái. Sau đó, các khuẩn lạc thuần được nuôi cấy sinh trong môi trường AOB lỏng ở 28°C, lắc 160 rpm trong 7 ngày để tiến hành nghiên cứu sàng lọc. Thực hiện tương tự với vi khuẩn oxy hóa nitrite trên môi trường NOB gồm các thành phần khoáng cơ bản như trên môi trường AOB được thay thế $(NH_4)_2SO_4$ thành $NaNO_2$ (Spieck & Bock, 2005).

4.1.3.1. Phương pháp xác định hình dạng, đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Hình dạng kích thước và tính rỗng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow & Feltham, 1993).

Phản ứng Catalase: Dùng que cấy vô trùng lấy một ít khuẩn lạc phết lên lam kính, sau đó nhỏ một giọt dung dịch H_2O_2 (3%) lên lam. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính với Catalase sẽ có hiện tượng sủi bọt khí và ngược lại.

Phản ứng oxidase: Phết một ít vi khuẩn lên đĩa giấy đã tẩm dung dịch Tetramethyl-p-Phenylendiamin dihydrochlorid (1%) bằng que cấy vô trùng. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính sẽ làm giấy chuyển sang màu đen và ngược lại.

Tính di động: Nhỏ một giọt nước cất lên lam kính, dùng que cấy vô trùng trải đều vi khuẩn lên lam, đặt bằng lamén và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 40X. Tính di động được xác định dựa theo cảm nang của Barrow and Feltham (1993).

4.1.3.2. Phương pháp sàng lọc trong phòng thí nghiệm

Các chủng vi khuẩn phân lập được sàng lọc bằng phương pháp phản ứng màu với thuốc thử Griess-Ilosvay (Yang et al., 2011). Cụ thể, nhỏ 1 giọt thuốc thử vào ống nghiệm chứa 5 mL huyền phù vi khuẩn oxy hóa ammonia nuôi sau 7 ngày. Những ống dương tính cho phản ứng có màu hồng được xác định nồng độ TAN bằng phương pháp APHA (2017) để đánh giá hiệu quả chuyển hóa đạm và trữ lạnh ở -80°C với 25% glycerol cho các nghiên cứu sau. TAN là tổng nồng độ NH_3 và NH_4^+ , trong nước được thu và trữ lạnh ở 4°C trước khi phân tích bằng so màu quang phổ theo phương pháp Phenate (APHA, 2017). Tiến hành tương tự đối với vi khuẩn oxy hóa nitrite, tuy nhiên chọn những ống âm tính với thuốc thử cho phản ứng không màu hoặc màu nhạt nhất và xác định nồng độ NO_2^- bằng phương pháp Sulphanilamide (APHA, 2017).

4.1.3.3. Đánh giá khả năng chuyển hóa đạm của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Chọn 5 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa mạnh nhất để đánh giá khả năng chuyển hóa đạm theo phương pháp Chankaew et al. (2017) với một vài sự thay đổi. Các chủng chuyển hóa đạm ammonia tiềm năng được nuôi tăng sinh và ly tâm với vận tốc 5.000 rpm trong 10 phút để thu sinh khối tế bào, rửa lại 2 lần bằng dung dịch muối sinh lý (0,85% NaCl). Sau đó, 1 mL dịch sinh khối tế bào (10^6 CFU/mL) đã được điều chỉnh mật độ quang $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ cho vào ống nghiệm 10 mL môi trường chuyên biệt AOB đã điều chỉnh nồng độ 100 mg N- NH_4^+ /L (kết quả ngày 0 đo được còn khoảng 65 mg/L). Tiến hành tương tự đối với vi khuẩn oxy hóa nitrit trên môi trường NOB đã điều chỉnh nồng độ 100 mg N- NO_2^- /L. Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp lại, ủ ở 28°C trên máy lắc với vận tốc 160 rpm trong điều kiện che tối, sau 5 ngày nuôi xác định nồng độ TAN, N- NO_2^- , N- NO_3^- bằng phương pháp so màu quang phổ (APHA, 2017). Khả năng oxy hóa ammonia được đánh giá thông qua hàm lượng TAN trong 5 mẫu nghiên cứu theo thời gian. Chủng vi khuẩn nào có khả năng oxy hóa ammonia tốt thì hàm lượng TAN có xu hướng giảm sau 5 ngày nghiên cứu, ngược lại đối với chủng vi khuẩn oxy hóa nitrite được đánh giá thông qua hàm lượng N- NO_2^- giảm theo thời gian nghiên cứu.

4.1.4. Phân lập và nuôi tăng sinh vi khuẩn trên môi trường lỏng

4.1.4.1. Môi trường phân lập

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

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5g
K_2HPO_4	1g
$\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,03g
NaCl	0,3g
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,3g
CaCO_3	7,5g
Nước cất	1000 mL

Sau khi hòa tan các thành phần của môi trường thì tiến hành chuẩn pH 8,0 bằng dung dịch NaOH 1M. Tiệt trùng dung dịch môi trường ở 121°C trong 20 phút.

4.1.4.2. Môi trường nuôi sinh khối

Được chuẩn bị theo công thức môi trường của Lewis and Pramer (1958) và MacDonad and Spokes (1980) như sau:

Na_2HPO_4	13,5 g/L
KH_2PO_4	0,7 g/L
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
NaHCO_3	0,5 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5 g/L
$\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$	0,0142 g/L
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	0,0184 g/L
Nước cất	1000 mL

Thêm một ít Tris HCl vào để tránh sự kết tủa của các nguyên tố vi lượng trong môi trường. Chuẩn pH = 8 (dùng NaOH 1M để chuẩn). Thuộc thử Griess - Ilosway dùng kiểm tra sự hiện diện của NO_2^- bao gồm 3 dung dịch A, B, C dưới đây:

Dung dịch A: 0,6g sulfanilic acid được hoà tan trong 10mL nước cất nóng (90°C), để nguội sau đó 20 mL HCl đậm đặc được cho thêm vào. Hỗn hợp này được pha loãng thành 100 mL với nước cất rồi trộn đều.

Dung dịch B: 0,6g, α -naphthylamine được hoà tan trong 10 - 20mL HCl đậm đặc, sau đó pha loãng thành 100 mL với nước cất và trộn đều.

Dung dịch C: 16,4g sodium acetate được hoà tan trong nước cất, pha loãng thành 100 mL với nước cất rồi trộn đều. Bảo quản riêng biệt từng dung dịch này trong 3 chai tối, dung dịch được giữ trong tủ lạnh, thời gian sử dụng không quá 1 tháng.

4.1.4.3. Phương pháp phân lập

Các bước phân lập: Chuẩn bị các chai 250 mL chứa 90 mL nước cất và các ống nghiệm chứa môi trường ammonium-calcium-carbonate đã được tiệt trùng (Ehrlich, 1975). Mẫu bùn ở 3 vị trí của ao được trộn lẫn nhau rồi chuyển 10 g bùn hỗn hợp vào chai chứa 90 mL nước cất tiệt trùng, lắc đều sau đó chuyển 1 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn vào các ống nghiệm môi trường ammonium-calcium-carbonate. Các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn này và các ống đối chứng âm (không cho dung dịch vi khuẩn vào) được ủ ở 28°C khoảng 21 ngày. Sau khi ủ, kiểm tra sự hiện diện của NO_2^- bằng thuốc thử Griess – Ilosway.

Xác định dương tính đối với nhóm *Nitrosomonas* sp.: Dung dịch thuốc thử A, B, C được trộn lẫn theo tỉ lệ 1:1:1, sau đó vài giọt dung dịch huyền phù vi khuẩn được thêm vào và lắc đều và sự chuyển màu của hỗn hợp được quan sát trong 5 phút. Phản ứng có màu hồng đậm hoặc nhạt chứng tỏ có sự hiện diện của nhóm AOB trong môi trường vì nhóm vi khuẩn AOB sẽ chuyển hóa một phần hoặc hoàn toàn $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ có trong môi trường thành NO_2^- , các ống đối chứng âm không cho phản ứng màu.

4.1.4.4. Phương pháp nuôi tăng sinh

Để thu được mật độ vi khuẩn cao và loại bỏ vi khuẩn tạp, cho 20 mL môi trường nuôi tăng sinh vào các ống falcon. Sau đó 1 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn được chuyển từ các ống nghiệm chứa môi trường ammonium-calcium-carbonate đã xác định sự hiện diện của AOB cho vào các ống falcon này. Các ống được ủ trong bóng tối ở 28°C trên

máy lắc trong vòng 3 tuần. Mỗi tuần thêm vào các ống môi trường trên dung dịch 0,53 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 0,005 mL dung dịch NaOH 1M đã tiệt trùng (Lewis & Pramer, 1958). Sau 3 tuần kiểm tra sự có mặt của NO_2^- ở các ống môi trường phân lập vi khuẩn bằng thuốc thử Griess–Ilosvay và mỗi tuần kiểm tra khả năng nhiễm vi khuẩn dị dưỡng trong các ống đó bằng môi trường TSA (bổ sung 1,5% NaCl).

Sau 4 ngày nếu không có vi khuẩn phát triển trên môi trường đó chứng tỏ đã thu được giống vi khuẩn *Nitrosomonas* thuần. Sau khi phân lập, vi khuẩn *Nitrosomonas* thuần được trữ ở -80°C với 15% glycerol (Montràs et al., 2008), hoặc bằng cách nuôi trong môi trường lỏng trên máy lắc ủ trong thời gian dài có che tối ở 28°C . Trong thời gian đó, dung dịch dinh dưỡng 0,53 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 0,005 mL dung dịch NaOH 1M đã tiệt trùng được cung cấp định kỳ 4 ngày/lần (Aleem & Alexander, 1960).

4.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

4.2.1. Đặc điểm khuẩn lạc

Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường AOB đa số khuẩn lạc có dạng đồng tâm, bề mặt phẳng, trắng ngà, bìa nguyên, kích thước 0,5 - 4,1 mm. Tương tự trên môi trường NOB khuẩn lạc có dạng đồng tâm, bề mặt phẳng, trắng đục, bìa nguyên chiếm đa số, kích thước 0,1- 4,1 mm.

Bảng 4.1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập

Hình thái	Đặc điểm	AOB (%)	NOB (%)
Hình dạng	Tròn nhỏ	34,50	42,86
	Tròn to	19,00	9,52
	Đồng tâm	46,50	47,62
Màu sắc	Trắng ngà	55,20	41,27
	Trắng đục	41,40	55,56
	Vàng cam	3,40	3,17
Dạng bìa	Nguyên	81,00	87,30
	Không đều	19,00	12,70
Độ nổi	Phẳng	84,50	79,40
	Mô	15,50	20,60

4.2.2. Đặc điểm tế bào vi khuẩn

Kết quả quan sát tiêu bản nhuộm Gram dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100X thu được kết quả như sau: 56/58 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường AOB (chiếm 96,6%), 62/63 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường NOB (chiếm 98,4%) là vi khuẩn Gram âm, trong đó các chủng vi khuẩn được phân lập trên cả 2 môi trường có tế bào hình que ngắn chiếm tỉ lệ cao nhất.

Bảng 4.2. Đặc điểm tế bào của các chủng phân lập

Hình dạng	AOB (%)	NOB (%)
Que ngắn	34,5	46,0
Cầu to	19,0	1,6
Cầu nhỏ	24,1	23,8
Quả lê	19,0	27,0
Que dài	3,4	1,6

4.2.3. Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn chuyển hóa

Các chủng vi khuẩn phân lập được đều không có khả năng sinh bào tử. Trong số 58 chủng phân lập trên môi trường AOB, 39 chủng có khả năng di động, 42 chủng có phản ứng oxidase dương tính và 19 chủng có phản ứng catalase dương tính. Trong số 63 chủng phân lập trên môi trường NOB, 54 chủng có khả năng di động, 56 chủng có phản ứng oxidase dương tính và 14 chủng có phản ứng catalase dương tính.

4.2.4. Khả năng oxy hóa ammonia của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

4.2.4.1. Biến động hàm lượng TAN

Kết quả cho thấy sau 5 ngày nghiên cứu, hàm lượng TAN của chủng vi khuẩn nghiên cứu giảm mạnh về cuối giai đoạn thí nghiệm nhưng xu hướng giảm không đều qua từng ngày. Trong đó thí nghiệm với chủng TB7.2 có kết quả hàm lượng TAN giảm đi nhiều nhất từ $61,5 \pm 7,2$ mg/L xuống còn $37,5 \pm 5,8$ mg/L (tỷ lệ giảm đạt 39,02%), ngược lại đối với

chủng TV3.1 có tỷ lệ chuyển hóa thấp nhất đạt 33,06% (từ $59,5 \pm 4$ mg/L còn $39,83 \pm 2,8$ mg/L), giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 4.3. Sự suy giảm hàm lượng TAN (mg/L) bởi vi khuẩn AOB

Chủng	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
CN6.1	$60,0 \pm 2,4^a$	$47,3 \pm 8,4^a$	$44,3 \pm 2,7^{abc}$	$43,0 \pm 2,6^{ab}$	$41,6 \pm 1,4^a$	$40,1 \pm 4,4^a$
CN2.1	$58,9 \pm 5,6^a$	$52,2 \pm 4,4^a$	$39,8 \pm 3,3^a$	$38,8 \pm 4,9^a$	$37,7 \pm 3,3^a$	$38,5 \pm 2,0^a$
CN8.1	$63,1 \pm 3,0^a$	$43,2 \pm 2,5^a$	$42,9 \pm 2,9^{ab}$	$41,0 \pm 2,2^{ab}$	$41,7 \pm 5,0^a$	$40,8 \pm 8,0^a$
TB7.2	$61,5 \pm 7,2^a$	$48,2 \pm 4,5^a$	$46,7 \pm 1,3^{bc}$	$46,1 \pm 1,4^b$	$44,4 \pm 5,5^a$	$37,5 \pm 5,8^a$
TV3.1	$59,5 \pm 4,0^a$	$51,2 \pm 2,5^a$	$48,0 \pm 2,2^c$	$44,3 \pm 2,0^{ab}$	$42,2 \pm 5,1^a$	$39,8 \pm 2,8^a$

Ghi chú: Các giá trị trung bình (TB) \pm độ lệch chuẩn (ĐLC) có các ký tự mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4.2.4.2. Biến động hàm lượng $N-NO_2^-$

Sau 5 ngày theo dõi, hàm lượng $N-NO_2^-$ có xu hướng tăng nhưng không đồng đều theo từng ngày, $N-NO_2^-$ tăng cao ở ngày 2 và giảm mạnh vào ngày 3. Điều này có thể do vi khuẩn chuyển hóa nitrite đã phát triển làm cho $N-NO_2^-$ giảm nhanh.

Bảng 4.4. Hàm lượng $N-NO_2^-$ (mg/L) tạo thành bởi vi khuẩn AOB

Chủng	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
CN6.1	$0,05 \pm 0,03^a$	$0,2 \pm 0,1^a$	$0,4 \pm 0,1^a$	$0,2 \pm 0,1^a$	$0,2 \pm 0,1^{ab}$	$0,1 \pm 0,03^a$
CN2.1	$0,06 \pm 0,01^a$	$0,4 \pm 0,1^b$	$0,5 \pm 0,1^a$	$0,2 \pm 0,1^a$	$0,4 \pm 0,1^c$	$0,2 \pm 0,07^{bc}$
CN8.1	$0,05 \pm 0,02^a$	$0,3 \pm 0,1^b$	$0,5 \pm 0,1^a$	$0,4 \pm 0,1^b$	$0,2 \pm 0,1^{ab}$	$0,1 \pm 0,03^a$
TB7.2	$0,04 \pm 0,03^a$	$0,1 \pm 0,01^a$	$0,4 \pm 0,1^a$	$0,3 \pm 0,1^a$	$0,2 \pm 0,1^a$	$0,2 \pm 0,04^{ab}$
TV3.1	$0,04 \pm 0,01^a$	$0,2 \pm 0,02^a$	$0,5 \pm 0,1^a$	$0,4 \pm 0,1^b$	$0,3 \pm 0,1^{bc}$	$0,3 \pm 0,08^c$

Các giá trị trung bình (TB) \pm độ lệch chuẩn (ĐLC) có các ký tự mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Tương ứng với hàm lượng TAN ít nhất, chủng TB7.2 đạt nồng độ $N-NO_2^-$ $0,15 \pm 0,04$ mg/L cao hơn có ý nghĩa thống kê so với chủng TV3.1 ($p < 0,05$) nhưng không có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại.

Dựa trên đánh giá sơ bộ đặc điểm hình thái và hoạt tính oxy hóa ammonia đã tuyển chọn được chủng TB7.2 có khả năng oxy hóa mạnh ammonia sau 5 ngày nuôi đạt hiệu suất chuyển hóa 39,02%.

4.2.5. Khả năng chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn chọn lọc

4.2.5.1. Biến động hàm lượng $N-NO_2^-$

Kết quả đánh giá cho thấy hàm lượng nitrite giảm mạnh về cuối đợt thí nghiệm nhưng không theo xu hướng liên tục.

Tuy nhiên, đến ngày 5 thì các chủng vi khuẩn vẫn có khả năng xử lý nitrite rất tốt như TB7.1 và TV4.2 tương ứng với tỷ lệ $N-NO_2^-$ giảm đi cao nhất lần lượt từ 91,6 mg/L xuống 63,2 mg/L (tỷ lệ giảm 31,64%), và từ 88,17 mg/L còn 63,67 mg/L (tỷ lệ giảm đạt 27,8%). Trong khi đó chủng CN7.1 có tỷ lệ giảm thấp nhất đạt 23% (87,7 mg/L còn 67,5 mg/L).

Bảng 4.5. Sự suy giảm $N-NO_2^-$ (mg/L) bởi vi khuẩn NOB

Chủng	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
TV4.2	88,2 \pm 2,8 ^a	84,3 \pm 4,6 ^a	86,5 \pm 3,5 ^a	73,3 \pm 5,8 ^a	67,0 \pm 3,0 ^a	63,7 \pm 6,7 ^a
CN6.2	91,2 \pm 4,3 ^a	79,5 \pm 4,4 ^a	88,8 \pm 6,8 ^a	68,8 \pm 2,6 ^a	71,7 \pm 1,2 ^{bc}	68,7 \pm 8,1 ^a
CN7.1	87,7 \pm 3,3 ^a	81,0 \pm 7,0 ^a	88,3 \pm 6,8 ^a	69,8 \pm 5,1 ^a	70,0 \pm 2,6 ^{ab}	67,5 \pm 4,4 ^a
TB7.1	91,6 \pm 4,3 ^a	79,8 \pm 6,3 ^a	85,7 \pm 6,5 ^a	72,8 \pm 9,0 ^a	72,7 \pm 0,3 ^{bc}	63,2 \pm 2,5 ^a
TB3.2	88,8 \pm 5,2 ^a	77,2 \pm 10,1 ^a	85,2 \pm 5,5 ^a	72,8 \pm 0,6 ^a	74,8 \pm 0,6 ^c	67,2 \pm 1,9 ^a

Ghi chú: Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có các ký tự mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4.2.5.2. Biến động hàm lượng N-NO₃⁻

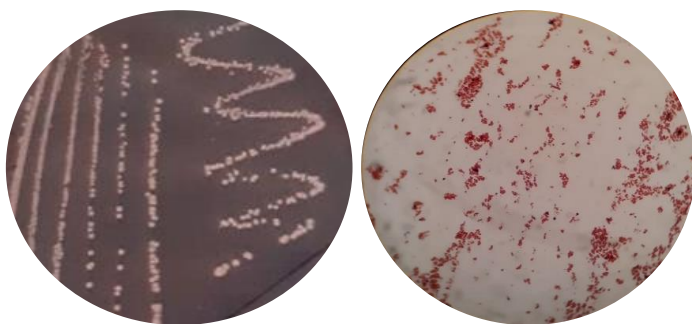
Hàm lượng N-NO₃⁻ có xu hướng tăng theo thời gian thí nghiệm. Cuối giai đoạn thí nghiệm, chủng TV4.2 có hàm lượng N-NO₃⁻ cao nhất, dao động từ 0,2 đến 16,2 mg/L và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Chủng CN6.2 đạt hàm lượng N-NO₃⁻ thấp nhất với 8,0 mg/L, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với dòng TV4.2 và CN7.1 nhưng không có ý nghĩa so với dòng TB7.1 và TB3.2.

Như vậy, sau khi xác định hoạt tính của 5 chủng vi khuẩn thí nghiệm, tuyển chọn được chủng TV4.2 có khả năng oxy hóa nitrite 27,8% nồng độ nitrite ban đầu thuộc nhóm trực khuẩn Gram âm.

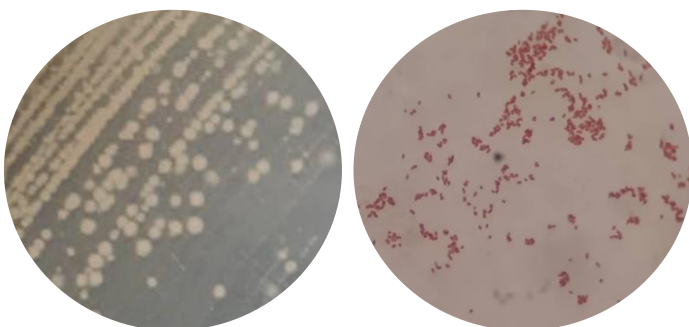
Bảng 4.6. Hàm lượng N-NO₃⁻ (mg/L) tạo thành bởi vi khuẩn NOB

Chủng	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
TV4.2	0,2±0,06 ^a	0,63±0,06 ^c	1,13±0,05 ^a	9,1±0,8 ^b	9,0±1,0 ^a	16,2±1,8 ^c
CN6.2	0,22±0,09 ^a	0,66±0,03 ^c	1,14±0,06 ^a	7,0±1,1 ^a	7,2±0,4 ^a	8,0±0,3 ^a
CN7.1	0,16±0,07 ^a	0,18±0,03 ^a	1,11±0,13 ^a	6,0±1,0 ^a	7,0±0,3 ^a	11,6±0,3 ^b
TB7.1	0,25±0,07 ^a	0,59±0,02 ^c	1,0±0,30 ^b	6,9±1,7 ^a	8,2±1,4 ^a	10,6±0,9 ^{ab}
TB3.2	0,19±0,07 ^a	0,43±0,12 ^b	1,15±0,03 ^a	11,9±0,7 ^c	7,9±1,8 ^a	10,6±1,7 ^{ab}

Ghi chú: Các giá trị trung bình (TB) ± độ lệch chuẩn (ĐLC) có các ký tự mũ khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 4.2. Hình dạng khuẩn lạc (trái) và tế bào nhuộm Gram (phải) của vi khuẩn AOB TB7.2



Hình 4.3. Hình dạng khuẩn lạc (trái) và tế bào nhuộm Gram (phải) của vi khuẩn AOB TV4.2

4.3. KẾT LUẬN

Với việc mô tả ngắn gọn, dễ hiểu và có hệ thống qui trình phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn chuyển hóa đạm ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản, có thể được sử dụng dễ dàng. Các công ty thủy sản có thể nghiên cứu, tự phân lập và phát triển phục vụ cho nhu cầu sản xuất. Qui trình còn đề cập các bước thực hiện, chuẩn bị môi trường nuôi tăng sinh để người nuôi có thể áp dụng trong những điều kiện phù hợp.

QUI TRÌNH 5
PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN
LỢI KHUẨN *Bacillus* sp. CHO XỬ LÝ NƯỚC
AO NUÔI TÔM *Litopenaeus vannamei*

5.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

5.1.1. Thiết bị và hóa chất

Trang thiết bị: Tủ cấy vô trùng (Anh), tủ ủ (Sanyo, Nhật), tủ đông sâu -86°C, tủ mát (Alaska), nồi hấp tiệt trùng (Nhật), tủ sấy (Đức), máy ly tâm Rotina (Đức), cân điện tử (Đức), máy khuấy từ gia nhiệt (Hàn Quốc), Máy lắc orbital (Advantage Lab - Bỉ), máy so màu (Helios Alpha, England). Micropipete các loại (Lab System, Đức).

Hóa chất: Sử dụng trong quá trình phân tích được cung cấp bởi nhà sản xuất Merck hoặc Sigma bao gồm Ethanol 98°, H₂SO₄, Phenol (C₆H₅OH), NaOH, Na₂[Fe(CN)₅NO]. 2H₂O, trisodium citrate dihydrate, NaOCl, (NH₄)₂SO₄, Sulfanilamide (H₂NC₆H₄SO₂NH₂), NaNO₂, acid phosphoric (H₃PO₄), N-(1-naphthyl)-ethylenediamine-dihydrochloride (C₁₀H₇NHCH₂CH₂NH₂.2HCl), casein, tris-HCl, Trichloroacetic acid, soluble starch, NaH₂PO₄, NaCl, Sodium carboxymethyl cellulose (Na-CMC) và hóa chất công nghiệp để xử lý nước như Chlorine 70% [Ca(ClO)₂], Sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃), Sodium Bicarbonate (NaHCO₃).

5.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường: Môi trường nuôi cấy vi khuẩn Nutrient Broth (NB), Nutrient Agar (NA), Tryptone Soya Broth (TSB), Tryptone Soya Agar (TSA), Mueller Hinton Agar (MHA) và Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS) được cung cấp bởi nhà sản xuất Merck (Đức).

5.1.3. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn

5.1.3.1. Thu và xử lý mẫu

Nơi thu mẫu bùn đáy là các ao tôm nuôi quảng canh ở các tỉnh Trà Vinh, Bạc Liêu, Cà Mau. Thu mẫu bùn bằng ống PVC đã tiệt trùng bằng dung dịch cồn 70°C. Tại mỗi ao, nên thu mẫu ở 3 vị trí: đầu ao, giữa ao và cuối ao theo một đường chéo. Giữ lạnh mẫu bằng nước đá và chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 3 - 5 giờ, sau đó bảo quản ở 4°C và xử lý trong vòng 2 giờ. Nên ghi đầy đủ các thông tin như tên ao, ngày tháng và thời gian thu mẫu trên nhãn dán chai thu mẫu.

5.1.3.2. Phương pháp phân lập

Cân 1 g mẫu bùn pha vào 9 mL nước muối (0,85% NaCl) tiệt trùng và xử lý nhiệt ở 80°C trong 20 phút. Sau đó, trải đều 100 µl mẫu pha loãng ở nồng độ thích hợp (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) trên đĩa thạch Nutrient Agar (NA), ủ ở 28°C trong 24 giờ. Chọn các khuẩn lạc đơn và cấy ria nhiều lần trên đĩa thạch NA để thu khuẩn lạc thuần. Kiểm tra, định danh các chủng phân lập và trữ lạnh ở -80°C trong môi trường Nutrient Broth (NB) với 20% glycerol.

5.1.3.3. Đặc điểm nhận dạng

a. Các đặc điểm sinh hóa

Quan sát các chủng vi khuẩn thuần phát triển trên môi trường NA với các đặc điểm hình thái tế bào dưới kính hiển vi quang học (Olympus, Nhật) và kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản như:

Nhuộm Gram: Quan sát độ thuần và hình thái của các chủng vi khuẩn bằng tiêu bản nhuộm Gram theo cách như sau: Dùng que cấy vô trùng lấy 1 ít khuẩn lạc đã tách rỗng hòa vào giọt nước muối sinh lý đã tiệt trùng ở giữa phiến kính, để khô trong phòng thí nghiệm. Cố định tiêu bản bằng cách hơi nhanh trên ngọn lửa đèn cồn 2 - 3 lần để gắn chặt vi khuẩn vào phiến kính. Sau đó tiến hành nhuộm với dung dịch tím tinh thể (Crystal Violet) trong 1 phút, rửa lại bằng nước cất. Nhuộm tiếp bằng dung dịch Lugol trong 1 phút, rửa bằng nước cất. Nhuộm tiếp bằng dung dịch Lugol trong 1 phút, rửa bằng nước cất. Nhỏ 1-2 giọt dung dịch

Alcohol 95% cho đến khi mất màu, rửa lại bằng nước cất. Sau đó nhuộm tiếp dung dịch Safranin trong 1 phút, rửa nước cất, để khô. Quan sát với giọt dầu ở vật kính 100x. Nếu nhuộm đúng, vi khuẩn Gram dương bắt màu tím, Gram âm bắt màu hồng.

Phản ứng Catalase: Dùng que cấy vô trùng lấy một ít khuẩn lạc phết lên lam kính, sau đó nhỏ một giọt dung dịch H_2O_2 (3%) lên lame. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính với Catalase sẽ có hiện tượng sủi bọt khí và ngược lại.

Phản ứng oxidase: Phết một ít vi khuẩn lên đĩa giấy đã tẩm dung dịch Tetramethyl-*p*-Phenylendiamin dihydrochlorid (1%) bằng que cấy vô trùng. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính sẽ làm giấy chuyển sang màu đen và ngược lại.

Tính di động: Nhỏ một giọt nước cất lên lam kính, dùng que cấy vô trùng trải đều vi khuẩn lên lam, đẩy bằng lamén và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 100x. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan and Steels (Barrow & Feltham, 1993) kết hợp với sử dụng bộ kit API 50CH (BioMerieux, Pháp).

b. Định danh bằng sinh học phân tử

Cấy các chủng vi khuẩn trên đĩa thạch NA và tiến hành giải trình tự 16S rRNA và định danh loài dựa trên cơ sở dữ liệu ngân hàng của NCBI (National Center for Biotechnology Information) với độ tương đồng 99-100%.

5.1.3.4. Khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*

a. Sàng lọc sơ bộ

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* của các chủng phân lập bằng phương pháp cấy vệt vuông góc. Phục hồi và nuôi tăng sinh vi khuẩn chỉ thị *V. parahaemolyticus*, chủng gây bệnh hoại tử gan tụy trên tôm trong môi trường TSB (bổ sung 1% NaCl) ở 30°C. Sau 12 giờ nuôi, chỉnh mật độ huyền phù vi khuẩn ở 10^6 CFU/mL (ở giá giá trị $OD_{600} = 0,005$). Cấy các chủng *Bacillus* phân lập dọc theo một đường thẳng trên môi trường MHA (bổ sung 1% NaCl) và ủ ở 30°C. Sau 48 giờ, tiến hành cấy vi khuẩn chỉ thị một đường vuông góc 90° với vệt cấy vi

khuẩn *Bacillus* đã phát triển, tiếp tục ủ ở 28°C trong 24 giờ. Xác định khả năng kháng khuẩn bằng cách đo khoảng cách vùng vô trùng theo đơn vị mm.

b. Đồng nuôi cấy

Chuẩn bị chủng *Bacillus* tiềm năng và vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* trong môi trường dinh dưỡng TSB theo mô tả ở mục 5.1.3.4a và đồng nuôi cấy 100 µL huyền phù của mỗi chủng vi khuẩn (mật độ 10^6 CFU) trong 10 mL TSB (bổ sung 1% NaCl) và ủ ở 30°C. Phần đối chứng nên được chuẩn bị riêng biệt với chủng lợi khuẩn tiềm năng và vi khuẩn gây bệnh ở cùng một điều kiện. Đánh giá mật độ vi khuẩn *Bacillus* và *Vibrio* tổng số ở các mốc thời gian 0, 24, 48, 72, 96, 120 giờ nuôi cấy bằng phương pháp cấy đĩa thạch trên môi trường TSA và TCBS.

5.1.3.5. Hoạt tính enzyme ngoại bào

Nuôi các chủng vi khuẩn với hoạt tính kháng khuẩn mạnh trong môi trường Minimal Broth (gồm 6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 10 g NaCl, 1 g NH_4Cl và 1000 mL nước cất) bổ sung lần lượt 1% casein/soluble starch/sodium carboxymethyl cellulose (Na-CMC) và ủ trên máy lắc ở 30°C. Sau 24 giờ nuôi, loại bỏ tế bào vi khuẩn bằng máy ly tâm ở tốc độ 10.000 rpm trong 10 phút ở 4°C và thu phần dịch trong phía trên để xác định hoạt tính enzyme protease, α -amylase và cellulase.

a. Hoạt tính protease: Ủ 100 µL dịch enzyme với 100 µL dung dịch 1% casein (pha trong dung dịch đệm Tris-HCl, pH 7,0) trong 10 phút ở 37°C và 500 µL dung dịch 5% trichloroacetic acid được thêm vào để ngừng phản ứng. Sau 20 phút, ly tâm hỗn hợp trên ở tốc độ 3.000 rpm trong 10 phút ở 4°C và thu phần dịch nổi phía trên để xác định hoạt tính enzyme theo phương pháp Lowry et al. (1951). Một đơn vị (U) của enzyme tương ứng với 1 µg tyrosine được phóng thích ở cùng điều kiện.

b. Hoạt tính α -amylase: Ủ 100 µL dịch enzym vi khuẩn với 100 µL dung dịch 1% soluble starch (pha trong dung dịch đệm NaH_2PO_4 20 mM và NaCl 6,7 mM) trong ống nghiệm thủy tinh ở 37°C trong 15 phút. Sau

đó, phản ứng sẽ tạo màu với 200 μ L dung dịch thuốc thử DNS và xử lý nhiệt ở 100°C trong 5 phút. Các ống nghiệm được làm lạnh và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Nồng độ enzym phóng thích 1 μ mol maltose ở cùng điều kiện chuẩn được xác định như một unit enzym amylase..

c. Hoạt tính cellulase: Ủ 0,5 mL dung dịch 1% Na-CMC (được chuẩn bị trong dung dịch đệm citrate 0.05 M, pH 5) và 0,5 mL dịch enzyme vi khuẩn được ở 50°C trong 30 phút, sau đó thêm 1,5 mL dung dịch thuốc thử DNS vào phản ứng và đun nóng 100°C trong 10 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm bằng phương pháp so màu quang phổ. Một đơn vị (U) enzyme được xác định như 1 μ mol glucose phóng thích ở cùng điều kiện.

5.1.3.6. Đánh giá mức độ an toàn của chủng lợi khuẩn trên tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*

Thuần tôm thẻ chân trắng với khối lượng 4 ± 1 g ở độ mặn 10‰, sau đó bố trí vào bể chứa 5L nước mặn 10‰ với mật độ 10 con/bể. Bố trí lô đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) và nghiệm thức bổ sung vi khuẩn (mật độ 5×10^8 CFU/mL), lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức. Nuôi vi khuẩn trong môi trường TSB, thu sinh khối tế bào bằng phương pháp ly tâm và rửa lại hai lần bằng nước muối sinh lý (0,85% NaCl), sau đó chỉnh mật độ quang $OD_{600}=1$ (tương ứng với 5×10^8 CFU/mL). Ở nghiệm thức bổ sung, cấy 5 mL huyền phù tế bào vào bể trong khi đó ở lô đối chứng thêm 5 mL nước muối sinh lý. Trong quá trình thí nghiệm, cho tôm ăn bình thường (3% trọng lượng tôm) và thay nước mỗi ngày. Sau mỗi lần thay nước, chuẩn bị huyền phù tế bào và nước muối sinh lý và bổ sung vào bể như phương pháp đề cập ở trên. Ghi nhận tỉ lệ sống của tôm và so sánh sau 7 ngày thí nghiệm.

5.1.4. Ứng dụng lợi khuẩn *Bacillus* trong xử lý nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*

Phục hồi và nuôi tăng sinh lợi khuẩn *Bacillus* sp. trong chai Duran chứa 150 mL môi trường TSB (bổ sung 1,5% NaCl để đạt độ mặn xấp xỉ với độ mặn nước ao). Sau 24 giờ ủ ở $29 \pm 1^\circ\text{C}$ mật độ *Bacillus* đạt 10^7 - 10^8 CFU/mL (tương đương 10^9 - 10^{10} CFU/150 mL) và kiểm tra lại bằng

phương pháp cấy trải (APHA, 2017). Bảo quản dung dịch gốc ở 4°C để phục vụ cho quá trình nuôi sinh khối trên thể tích lớn.



Hình 5.1. Hệ thống nuôi sinh khối vi khuẩn

Nguồn nước: Sử dụng nước ao để nuôi sinh khối vi khuẩn. Bơm nước vào bồn 200 lít qua túi lọc 20 μm , xử lý Chlorine $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$ 30 ppm để diệt khuẩn. Sau khi xử lý, sục khí liên tục và trung hòa Chlorine bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ trước khi sử dụng. Bổ sung NaHCO_3 để nâng hệ đệm và duy trì pH trong ngưỡng 7-8.

Nguyên liệu: Hỗn hợp nuôi sinh khối *Bacillus* đã được tiệt trùng bao gồm mật mía hoặc đường cát, men bánh mì và dung dịch gốc *Bacillus* sp. (10^7 - 10^8 CFU/mL) với tỉ lệ được trình bày ở Bảng 5.1.

Bảng 5.1. Công thức nuôi sinh khối vi khuẩn thể tích lớn

Nguyên liệu	Khối lượng
Mật mía/đường cát	300 g
Men bánh mì	150 g
Nước ao	150 L
Dung dịch <i>Bacillus</i>	150 mL

Ghi chú: Mật mía/đường cát và men bánh mì được hòa tan bằng nước nóng trước khi cho vào bồn ủ.

Bố trí hệ thống nuôi tăng sinh: Hệ thống nuôi tăng sinh nên được bố trí trong phòng kín hoặc khu vực sạch sẽ, thoáng mát, tránh ánh nắng chiếu trực tiếp. Thuận lợi cho việc di chuyển và quản lý. Hỗn hợp nguyên liệu và dung dịch vi khuẩn sau khi chuẩn bị nên được sục khí liên tục và che kín. Mật độ *Bacillus* sp. trong hỗn hợp ban đầu ước tính khoảng 10^4 - 10^5 CFU/mL. Sau 24 đến 36 giờ ủ, thu sinh khối vi khuẩn *Bacillus* sp. (ước tính đạt xấp xỉ 10^7 CFU/mL) để kiểm tra mật độ *Bacillus* sp. và bổ sung trực tiếp vào ao nuôi tôm để đạt nồng độ 10^3 CFU/mL (tương ứng với 100 lít dung dịch men ủ/1000 m³ nước ao). Sau đó, tiến hành vệ sinh hệ thống bằng nước ngọt và chuẩn bị cho lần kế tiếp. Việc bổ sung vi khuẩn được tiến hành định kỳ 3 ngày/lần (phụ thuộc vào điều kiện và thời gian nuôi). Để thấy rõ hiệu quả của việc bổ sung lợi khuẩn *Bacillus* sp. trong xử lý nước nuôi tôm thì các chỉ tiêu chất lượng nước như tổng đạm amon (TAN), nitrite (N-NO₂⁻) và mật độ lợi khuẩn *Bacillus* và *Vibrio* tổng số cần được kiểm tra định kỳ.



Hình 5.2. Ao thí nghiệm bổ sung lợi khuẩn *Bacillus* CM3.1

5.1.5. Phương pháp phân tích

5.1.5.1. Chỉ tiêu vi khuẩn

Mật độ vi khuẩn có thể được kiểm tra bằng phương pháp như sau: hút 1 mL mẫu vào ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý (0,9% NaCl) đã tiệt trùng đạt được độ pha loãng 10^{-1} . Lắc đều ống 10^{-1} bằng

máy Vortex trong 5 giây và hút 1 mL sang ống chứa nước muối sinh lý tiếp theo để được độ pha loãng 10^{-2} .

Lặp lại cách này cho đến khi đạt được độ pha loãng thích hợp, lưu ý lắc đều ống mẫu và thay đầu tít pipette mới trước khi tiến hành pha loãng. Sau đó hút 100 μ L dung dịch vi khuẩn ở mỗi ống pha loãng cho vào đĩa thạch TSA và TCBS để xác định mật độ *Bacillus* và *Vibrio* tổng số, trải đều cho đến khi khô và mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Đối với mẫu phân tích mật độ *Bacillus* tổng số nên được xử lý nhiệt ở 80°C trong 20 phút trước khi phân tích.

Ủ các đĩa thạch vừa cấy vi khuẩn được ở $28 \pm 1^\circ\text{C}$ sau 24 giờ. Kiểm tra các đĩa hình thành khuẩn lạc, đếm và chọn số khuẩn lạc ở các đĩa dao động trong khoảng 30 - 300 khuẩn lạc để đảm bảo độ tin cậy của phương pháp. Xác định mật độ vi khuẩn theo đơn vị hình thành khuẩn lạc cho mỗi 1 mL nước bằng công thức: Mật độ vi khuẩn (CFU/mL) = số khuẩn lạc trung bình \times độ pha loãng \times 10.

5.1.5.2. Môi trường chất lượng nước

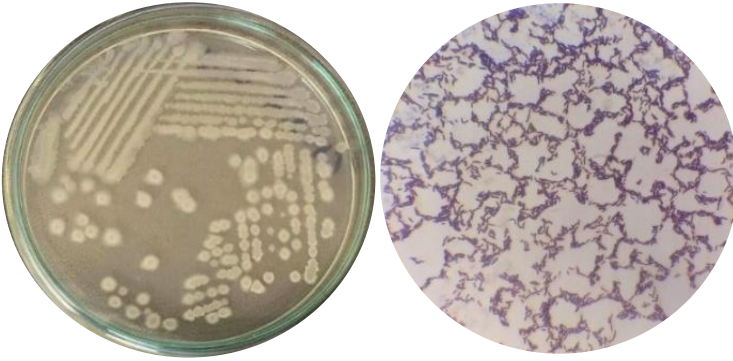
Các thông số nhiệt độ, pH và oxy hòa tan đo trực tiếp tại ao bằng các máy đo hoặc bút đo chuyên dụng như máy đo đa chỉ tiêu HANNA (HI9128, Woonsocket, RI, USA). TAN và N-NO_2^- phân tích bằng các bộ kit test nhanh hoặc so màu quang phổ bằng phương pháp Phenate và Sulphanilamide (APHA, 2017).

5.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

5.2.1. Phân lập và đặc điểm sinh hóa

Kết quả phân tích khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy NA ở 28°C sau 24 giờ cho thấy hầu hết các dòng vi khuẩn phân lập đều có khuẩn lạc dạng nhỏ tròn, bìa tròn đồng tâm, có một số khuẩn lạc dạng to tròn, bìa tròn không tâm nhẵn, kích thước dao động từ 0,3 - 3,1 mm. Đa số khuẩn lạc có màu trắng đục, bìa tròn răng cưa, tròn không tâm (47 loài chiếm 56,6 %), còn có khuẩn lạc màu trắng trong, bìa tròn đồng tâm, tròn đồng tâm nhẵn (36 loài chiếm 43,4%).

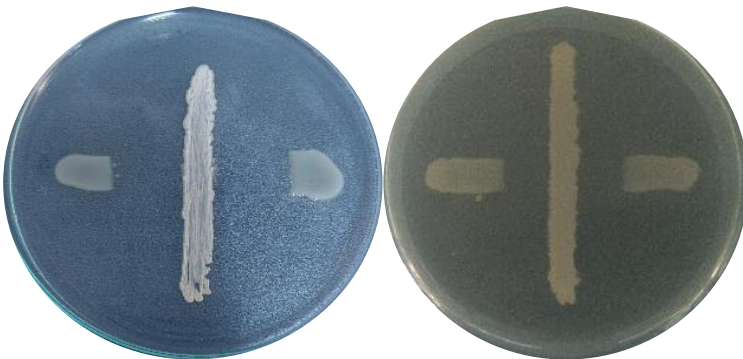
Kết quả nhuộm Gram cho thấy các chủng đều bắt màu tím xanh của crystal violet (gram dương). Tế bào vi khuẩn có dạng hình que ngắn (chiếm 50,6%), que dài (chiếm 20,5%) và một số hình cầu. Trong số 83 chủng phân lập thu được 44 chủng đều có khả năng di động và có khả năng sinh bào tử. Đồng thời các chỉ tiêu sinh hóa khi thử nghiệm catalase và oxydase đều dương tính tương đồng với các đặc tính của giống *Bacillus*.



Hình 5.3. Hình thái khuẩn lạc (trái) và tế bào gram dương của vi khuẩn *Bacillus* CM3.1

5.2.2. Sàng lọc khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus*

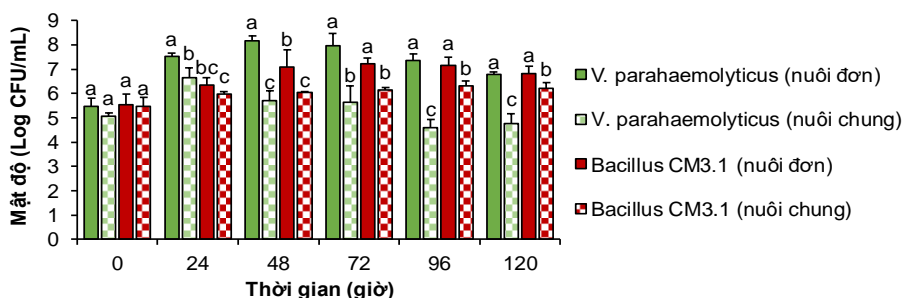
Kết quả cho thấy trong tổng 44 chủng vi khuẩn *Bacillus* có 13 chủng thể hiện hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus*, đặc biệt là chủng CM3.1 và CM2.2 với đường kính vòng vô trùng tương ứng 13,1 và 12,5 mm.



Hình 5.4. Khả năng kháng *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp cấy vệt vuông góc

5.2.3. Phương pháp đồng nuôi cấy

Kết quả cho thấy sau 120 giờ nuôi cấy thì mật độ *Bacillus* sp. không có sự khác biệt đáng kể ($p > 0,05$) giữa nghiệm thức nuôi đơn (6,8 log CFU/mL) và nuôi chung (6,2 log CFU/mL). Tuy nhiên khi nuôi chung mật độ *Vibrio* sp. có xu hướng giảm (4,75 log CFU/mL), thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với điều kiện nuôi đơn (6,766 log CFU/mL).



Hình 5.5. Biến động mật độ *V. parahaemolyticus* khi đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Bacillus* CM3.1

5.2.4. Hoạt tính enzyme ngoại bào

Hoạt tính protease không có sự khác biệt ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa hai chủng đánh giá. Tuy nhiên, hoạt tính α -amylase và cellulase sinh ra bởi chủng CM3.1 cao hơn có ý nghĩa so với chủng CM2.2.

Bảng 5.2. Hoạt tính enzyme của các chủng phân lập

Hoạt tính enzyme (U/mL)	Chủng vi khuẩn	
	CM2.2	CM3.1
Protease	140,3±15,5 ^a	141±12,2 ^a
α -amylaze	32,5±15,5 ^b	153,7±14,2 ^a
Cellulase	25,8±13,3 ^b	658,7±52,3 ^a

Ghi chú: Các ký tự (a) giống nhau trên mỗi hàng biểu thị cho sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

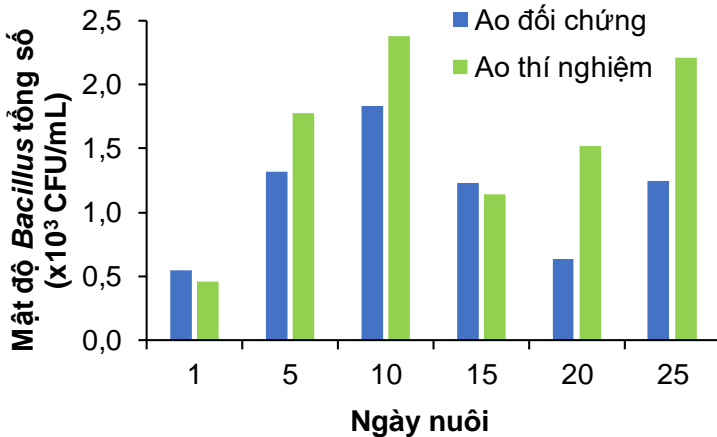
5.2.5. Đánh giá độ an toàn sinh học

Với đặc tính kháng khuẩn và hoạt tính enzyme cao nên chủng *Bacillus* CM3.1 được sử dụng bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi với

mật độ là 10^8 CFU/mL. Tỷ lệ sống của tôm sau 7 ngày đạt 100% đối với nghiệm thức bổ sung chủng *Bacillus* CM3.1, trong khi ở nghiệm thức đối chứng là 83%.

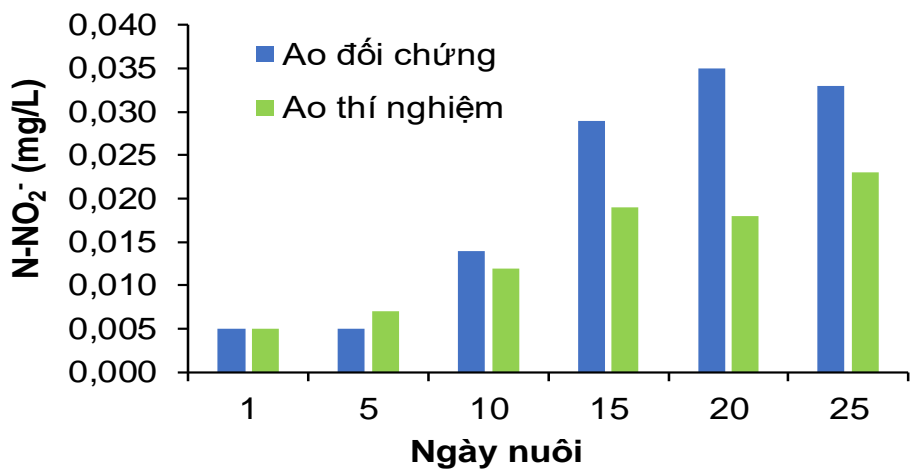
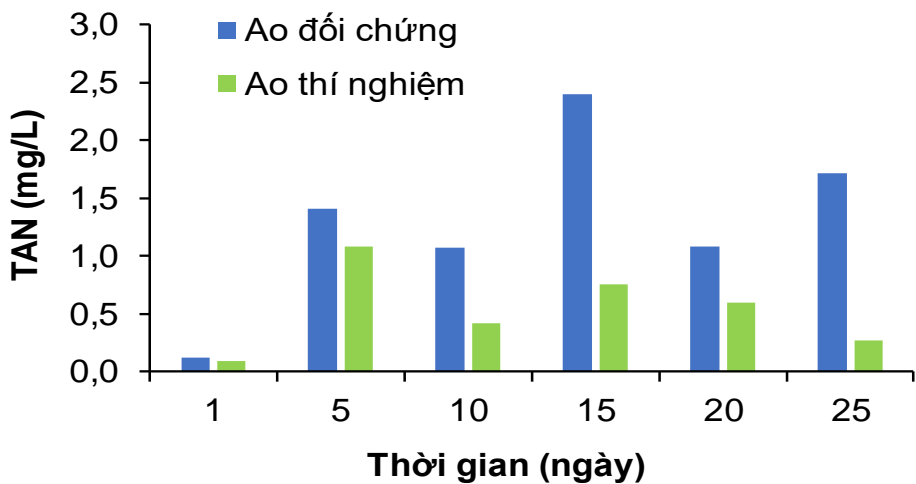
5.2.6. Ứng dụng *Bacillus* CM3.1 trong xử lý nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*

Kết quả cho thấy mật độ *Bacillus* tổng số ở ao thí nghiệm cao hơn đáng kể so với ao đối chứng. Theo đó, trong 10 ngày đầu mật độ vi khuẩn *Bacillus* ở ao đối chứng dao động $0,55 \times 10^3$ - $1,83 \times 10^3$ CFU/mL, trong khi đối với ao thí nghiệm là 0,46 - 2,38 CFU/mL. Vào ngày 15, mật độ *Bacillus* ở cả hai ao giảm mạnh, nhưng ao thí nghiệm vẫn duy trì mật độ cao hơn so với ao đối chứng đến ngày 25.



Hình 5.6. Mật độ *Bacillus* tổng số trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng

Theo thời gian nuôi, tổng đạm amon (TAN) tích lũy ở hàm lượng cao trong ao, tuy nhiên việc bổ sung lợi khuẩn *Bacillus* CM3.1 giúp giảm đáng kể hàm lượng TAN. Cụ thể là sau 15 ngày nuôi, TAN ở ao đối chứng đạt 2,395 mg/L, cao gấp 3 lần so với ao thí nghiệm bổ sung lợi khuẩn *Bacillus* CM3.1 là 0,757 mg/L. Đến ngày 25, TAN vẫn có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) giữa ao đối chứng (1,72 mg/L) và ao thí nghiệm (0,27 mg/L). Do mô hình siêu thâm canh nên quá trình thay nước đã làm $N-NO_2^-$ trong ao giảm thấp. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy, vào cuối giai đoạn thí nghiệm, $N-NO_2^-$ ở ao đối chứng (0,029 - 0,035 mg/L) cao hơn đáng kể so với ao thí nghiệm (0,019 - 0,023 mg/L).



Hình 5.7. Biến động TAN (trái) và $N-NO_2^-$ (phải) trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng

5.3. Kết luận

Với mô tả ngắn gọn, dễ hiểu và có hệ thống, qui trình phân lập và sàng lọc hoạt tính lợi khuẩn *Bacillus* có thể được sử dụng dễ dàng. Các công ty thủy sản có thể nghiên cứu, tự phân lập và phát triển phục vụ cho nhu cầu sản xuất. Qui trình còn đề cập các bước thiết lập hệ thống, chuẩn bị môi trường nuôi tăng sinh để người nuôi có thể áp dụng trong những điều kiện phù hợp.

QUI TRÌNH 6

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Lactobacillus* sp. VÀ PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM PROBIOTIC CHO TÔM THẺ CHÂN TRẮNG *Litopenaeus vannamei*

6.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

6.1.1. Trang thiết bị và hóa chất

Trang thiết bị: Tủ cấy vô trùng (Astec, Anh, Model 50546), tủ ủ (Sanyo, Nhật, Mir 262), tủ đông sâu (-86°C), tủ mát, nồi hấp tiệt trùng (Nhật), tủ sấy (Đức), cân điện tử (Sartorius, Đức), kính hiển vi Olympus CX21 (Olympus, Nhật), máy ly tâm Rotina (Hettich, Đức), Máy lắc orbital (Advantage Lab - Bỉ), máy so màu (Helios Alpha, England) máy sấy đông khô (Labconco, Mỹ). Micropipete các loại (Đức, Lab System).

Hóa chất: Ethanol 98°, NaCl, KCL, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaOH, HCl, D-glucose, sữa tách béo, NaOH, KI, H₂SO₄, casein, tyrosine, Tris-HCl, Trichloroacetic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, soluble starch, L-leucine-p-nitroanilide, p-nitroaniline, bromcresol purple và nước cất.

6.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường chọn lọc nuôi, cấy vi khuẩn *Lactobacillus* De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth, MRS agar, Nutrient Broth và Mueller Hinton Agar (MHA) được cung cấp với nhà sản xuất Merck (Đức).

6.1.3. Thu và xử lý mẫu

Thu mẫu tôm thẻ chân trắng trong các ao nuôi thâm canh ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), với khối lượng khoảng 10g/con. Bảo quản mẫu lạnh trong mỗi túi zipper riêng biệt và vận chuyển về phân tích tại phòng thí nghiệm.

6.1.4. Phân lập và nhận diện vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

Rửa sạch tôm bằng nước cất và khử trùng bên ngoài bằng cồn 70°. Nghiền nát ruột tôm trong ống eppendorf có chứa sẵn 1 mL nước muối

sinh lý vô trùng. Pha loãng mẫu với nước muối sinh lý để đạt độ pha loãng 10^{-1} - 10^{-3} . Thử tích 100 μL mẫu của mỗi độ pha loãng được trộn với 20 mL môi trường MRS có bổ sung 1,5% agar và 0,003% Bromocresol purple ở 45°C và đổ lên đĩa Petri đã tiệt trùng, sau đó ủ ở 37°C trong điều kiện kỵ khí trong 24 giờ. Sau khi được tách rỗng, chọn các chủng để phân tích hình thái và một số chỉ tiêu sinh hóa cơ bản để nhận dạng giống *Lactobacillus* theo phương pháp của Kandler and Wiss (1986). Nuôi tăng sinh các chủng *Lactobacillus* chọn lọc trong môi trường MRS broth ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, sau đó bảo quản ở nhiệt độ -80°C có bổ sung glycerol và sữa tách béo 10% cho các đánh giá tiếp theo.

6.1.5. Đánh giá khả năng kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Đánh giá khả năng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Phục hồi và nuôi tăng sinh vi khuẩn *V. parahaemolyticus* là chủng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm trong môi trường NB có bổ sung 1,5% NaCl và chuẩn bị ở mật độ 10^8 CFU/mL. Đối với vi khuẩn *Lactobacillus*, nuôi tăng sinh các chủng vi khuẩn này trong môi trường MRS broth ở 37°C trong 24 giờ. Ly tâm dung dịch vi khuẩn với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sử dụng phần dung dịch nổi cho quá trình đánh giá khả năng kháng khuẩn. Chuẩn bị môi trường thạch MHA. Tán đều dung dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã chuẩn bị ở trên lên môi trường thạch, sau đó tiến hành đục lỗ với đường kính $d=6$ mm trên bề mặt thạch. Thêm 100 μL dịch CFS của vi khuẩn *Lactobacillus* đã được chuẩn bị vào lỗ thạch, sau đó ủ 10 phút ở 4°C, kể đến là ủ ở 37°C trong 24 giờ. Xác định khả năng kháng khuẩn bằng sự hiện diện của vòng kháng khuẩn. Tính đường kính vòng kháng khuẩn (mm) như sau: $DK = Di - dw$ (trong đó Di là đường kính vòng ức chế vi khuẩn bao gồm đường kính lỗ (mm) và dw là đường kính lỗ (mm)). Đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn hoặc bằng 6 mm được xem là có khả năng ức chế.

6.1.6. Đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Lactobacillus* chọn lọc

Đánh giá các chủng *Lactobacillus* chọn lọc về khả năng tiết enzyme trên môi trường thạch. Sử dụng những chủng cho kết quả dương tính để

tiếp tục đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào. Các dung dịch CFS được đánh giá hoạt tính enzyme bao gồm protease, leu-aminopeptidase, và α -amylase theo mô tả ở mục 6.1.9. Lặp lại 3 lần cho mỗi tiến trình. Sử dụng dung dịch MRS vô trùng làm đối chứng.

6.1.7. Độ an toàn và sự phát triển vi khuẩn lactic (LAB) trong ruột tôm sau khi cho ăn

Để minh chứng cho sự miễn cảm của tôm thẻ chân trắng khi được cho ăn các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* chọn lọc, cần thí nghiệm về độ an toàn trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sử dụng chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn và có hoạt tính enzyme cao nhất để đánh giá độ an toàn và khả năng phát triển quần thể trong ruột tôm thẻ chân trắng bằng phương pháp cho ăn. Nuôi tăng sinh chủng *Lactobacillus* chọn lọc trong môi trường MRS ở 37°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút.

Rửa lại và pha loãng với dung dịch PBS (pH7,4) để đạt nồng độ 10^6 , 10^7 và 10^8 CFU/mL bằng phương pháp xác định giá trị OD₆₀₀. Sau đó, trộn đều 10 mL huyền phù vi khuẩn vào thức ăn viên cho tôm (ví dụ loại thức ăn HI-PO 7701, CP Group, Việt Nam) để đạt được liều lượng 10^7 , 10^8 và 10^9 CFU/kg thức ăn và sấy khô ở 37°C trong vòng 30 phút. Kiểm tra mật độ *Lactobacillus* trong thức ăn bổ sung bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường MRS agar trước khi tiến hành thí nghiệm.

Bố trí tôm thẻ chân trắng (~5,0 g) thí nghiệm trong bể chứa 100 L nước lợ 15‰ với mật độ khoảng 10 con/bể, bố trí hệ thống sục khí, lặp lại ba lần. Thiết kế thí nghiệm với bốn nghiệm thức bao gồm đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) và các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn (10^7 , 10^8 và 10^9 CFU/kg thức ăn). Cho tôm ăn thức ăn đã chuẩn bị sẵn với tần suất 2 lần/ngày với tỉ lệ cho ăn 3% trọng lượng thân.

Sau khi cho ăn liên tục trong 7 ngày, có thể đánh giá tỉ lệ sống và mật số của tổng vi khuẩn lactic (LAB) trong ruột tôm.

6.1.8. Sàng lọc cơ chất phát triển probiotic dạng bột

6.1.8.1. Chuẩn bị tế bào lợi khuẩn

Chuẩn bị tế bào lợi khuẩn *Lactobacillus* sp. như mô tả ở mục 1.7 và bổ sung glycerol và protein skim milk 10%, sau đó trữ đông ở nhiệt độ -20°C trong 24 giờ. Sấy đông khô mẫu trong 24 giờ (thời gian tùy theo khối lượng mẫu). Sau khi sấy khô, nghiền mẫu mịn thành bột và xác định mật số lợi khuẩn trong mẫu bằng phương pháp đếm trên đĩa thạch MRS. Sau đó phối trộn mẫu với sữa tách béo để đạt được mật số 10^9 CFU/g và bảo quản ở 4°C cho đến khi tiến hành đánh giá độ ổn định của lợi khuẩn theo thời gian.

6.1.8.2. Xử lý và phát triển sản phẩm probiotic dạng bột

Có thể sử dụng các cơ chất có nguồn gốc từ địa phương như: bột lactose, sữa tách béo, cám gạo, vỏ đậu nành, Dolomite hoặc Dextrose. Xử lý nhiệt nguồn nguyên liệu ở 85°C trong 1 giờ để diệt hệ vi khuẩn nội sinh trong cơ chất. Cân và phối trộn đường Dextrose lần lượt với từng loại cơ chất với tỉ lệ 1:4. Trộn đều bột lợi khuẩn đông khô với mật độ ban đầu 10^9 CFU/g vào từng loại hỗn hợp cơ chất trong điều kiện vô trùng để đạt mật độ 10^8 CFU/g. Sau đó trữ sản phẩm probiotic LAB trong các túi nhôm kín khí và bảo quản ở hai mức nhiệt độ khác nhau là $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ và $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. Các mức nhiệt độ này phù hợp với điều kiện thực tiễn khi sản phẩm có khả năng bảo quản ở tủ mát hoặc ở nhiệt độ phòng trong quá trình sử dụng sản phẩm. Nên đánh giá mật độ vi khuẩn, tỉ lệ chết tuyệt đối của tế bào, hoạt tính enzyme protease và α -amylase mỗi tuần.

6.1.9. Phương pháp phân tích

Mật độ LAB: Cân 1 g sản phẩm probiotic hoặc 1 mL mẫu vào ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý (0,9% NaCl) đã tiệt trùng được độ pha loãng 10^{-1} . Lắc đều ống 10^{-1} bằng máy Vortex trong 5 giây và hút 1 mL sang ống chứa nước muối sinh lý tiếp theo được độ pha loãng 10^{-2} . Lặp lại cách này cho đến khi đạt được độ pha loãng 10^{-5} , lưu ý lắc đều ống mẫu và thay đầu tip pipette mới trước khi tiến hành pha loãng. Sau đó hút 100 μL dung dịch vi khuẩn ở mỗi ống pha loãng cho vào trung tâm đĩa môi trường MRS agar đã được chuẩn bị trước, trải đều cho đến khi khô và mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Các đĩa môi trường vừa cấy vi

khuẩn được ủ ở 37°C trong điều kiện kỵ khí 24 giờ. Kiểm tra các đĩa hình thành khuẩn lạc, đếm và chọn số khuẩn lạc ở các đĩa dao động trong khoảng 30 - 300 khuẩn lạc để đảm bảo độ tin cậy của phương pháp. Mật độ vi khuẩn được xác định theo đơn vị hình thành khuẩn lạc cho mỗi 1 mL nước bằng công thức: Mật độ vi khuẩn (CFU/g) = số khuẩn lạc trung bình × độ pha loãng × 10.

Tính toán hằng số tế bào chết tuyệt đối của tế bào trong thời gian bảo quản dựa theo công thức:

$$k = (1/t) \times (\text{Log}N_0 - \text{Log}N_t) \text{ (Tsen et al., 2007)}$$

Trong đó: N_0 là mật độ tế bào ở thời điểm bắt đầu bảo quản (CFU/g); N_t là mật độ tế bào ở các lần phân tích (CFU/g); t là thời gian bảo quản (ngày).

Hoạt tính enzyme ngoại bào: Cân 1 g sản phẩm hoà tan vào 9 mL môi trường MRS broth và ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, ly tâm dung dịch nuôi cấy với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu phần dịch nổi phía trên để đánh giá hoạt tính enzyme.

Hoạt tính enzyme protease: Thực hiện đánh giá hoạt tính emzym này ở 40°C trong môi trường đệm Tris-HCl 100 mmol/L. Ủ 100 µL dung dịch CFS với 100 µL casein 1% (chuẩn bị trong đệm Tris-HCl, pH 9,0) trong 10 phút ở 37°C. Phản ứng được dừng lại sau khi thêm 500 µL dung dịch Trichloroacetic acid. Sau 20 phút, ly tâm hỗn hợp ở tốc độ 3.000 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Tiếp tục phân tích hoạt tính enzyme protease phần dung dịch nổi bằng phương pháp của Lowry et al. (1951). Mỗi đơn vị (Unit) hoạt tính enzyme protease tương đương với lượng enzyme cần thiết để phân giải casein và phóng thích 1 µg tyrosine/mL/phút.

Hoạt tính enzyme α -amylase: Xác định dựa vào sự hình thành phức chất giữa tinh bột và iod sau khi lợi khuẩn LAB lên men tinh bột ở 37°C (pH 6,0). Phương pháp được mô tả ngắn gọn như sau: Ủ 100 µL dung dịch CFS của lợi khuẩn LAB với 800 µL dung dịch chứa 0,03% tinh bột (pha trong đệm phosphate) trong 30 phút. Phản ứng được dừng lại sau khi thêm 100 µL dung dịch H₂SO₄ 0,1M. Thêm dung dịch iod (2,4 mL),

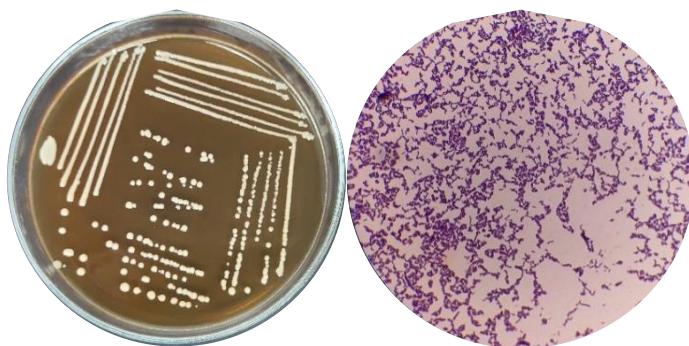
sau đó so màu hỗn hợp ở bước sóng 620 nm. Trong đó, 1 đơn vị (U) định nghĩa như là lượng enzyme để thủy phân 10 g tinh bột trong 30 phút trong điều kiện thí nghiệm.

Hoạt tính enzyme leu-aminopeptidase: Xác định hoạt tính này của vi khuẩn theo phương pháp mô tả ngắn gọn như sau: trộn 100 μ L dung dịch CFS của *Lactobacillus* với 1,9 mL dung dịch p-nitroaniline (p-NA) axit amin 1 mM (pha trong dung dịch đệm phosphate pH 7,2). Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 60 phút, sau đó đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 410 nm bằng máy so màu quang phổ (Helios Apha Thermo, USA). Trong đó, 1 Unit của hoạt tính enzyme được thể hiện bằng lượng enzyme để phóng thích ra 1 μ mol p-NA/giờ ở 37°C.

6.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

6.2.1. Phân lập và nhận dạng giống *Lactobacillus* trong ruột tôm thẻ chân trắng

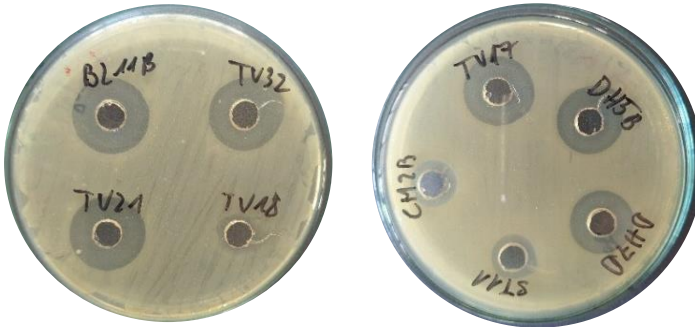
Tổng số 141 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. được phân lập dựa theo hình thái khuẩn lạc điển hình của vi khuẩn lactic (tròn, trắng, bờ đều). Hầu hết các chủng vi khuẩn đều có khuẩn lạc dạng tròn, bờ nguyên, có một vài khuẩn lạc có bờ gợn sóng, kích thước khuẩn lạc dao động từ 0,5 - 2,0 mm. Bề mặt khuẩn lạc trơn láng có màu trắng sữa (139 chủng, chiếm 98,6%). Trong đó, 23 chủng là vi khuẩn Gram dương, tế bào có dạng hình que, không có khả năng di động và không có khả năng sinh bào tử. Đồng thời, thử nghiệm catalase và oxydase đều cho kết quả âm tính, tương đồng với các đặc tính của giống *Lactobacillus* sp.



Hình 6.1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn *Lactobacillus* sp.

6.2.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch cho thấy trong tổng 23 chủng vi khuẩn *Lactobacillus*, có 10 chủng thể hiện khả năng kháng khuẩn với đường kính kháng khuẩn dao động từ 7,0-11,5 mm.



Hình 6.2. Vòng kháng khuẩn với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

6.2.3. Hoạt tính enzyme của *Lactobacillus* chọn lọc

Sau khi kiểm tra khả năng tiết enzyme ngoại bào trên đĩa thạch, 10 chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* đều có hoạt tính tiết enzyme ngoại bào protease và α -amylase. Kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về hoạt tính enzyme protease giữa các chủng được chọn ($p > 0,05$). Tuy nhiên, hoạt tính enzyme leu-aminopeptidase cao nhất ở chủng vi khuẩn TV32, và thấp nhất là chủng DH5B. Tương tự, chủng TV32 có khả năng tiết enzyme ngoại bào α -amylase cao nhất và cao hơn có ý nghĩa so với chủng DH5B.

Bảng 6.1. Hoạt tính enzyme ngoại bào của vi khuẩn

Hoạt tính enzyme (U/mL)	Chủng phân lập		
	TV32	TV21	DH5B
Protease	161,1 \pm 5,1 ^a	137,2 \pm 28,2 ^a	134,9 \pm 16,4 ^a
α -amylase	210,5 \pm 23,9 ^a	208,8 \pm 10,7 ^a	132,2 \pm 10,6 ^b
Leu-aminopeptidase	9,3 \pm 1,2 ^a	8,6 \pm 0,8 ^a	8,2 \pm 0,4 ^a

Ghi chú: Các ký tự (a) giống nhau trên mỗi hàng biểu thị cho sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

6.2.4. Độ an toàn và mật độ của chủng vi khuẩn chọn lọc trên tôm thẻ chân trắng

Với khả năng kháng khuẩn và hoạt tính enzyme cao so với các chủng còn lại, chủng TV32 được sử dụng để phối trộn với thức ăn ở liều 10^7 , 10^8 và 10^9 CFU/kg thức ăn và cho tôm thẻ chân trắng ăn, tỉ lệ sống của tôm được ghi nhận là 100% ở các nghiệm thức. Mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* spp. Trong nghiệm thức cho ăn TV32 ở liều 10^9 CFU/kg thức ăn được cải thiện so với nghiệm thức đối chứng với giá trị lần lượt là $8,2 \times 10^4$ CFU/tôm và $2,4 \times 10^2$ CFU/tôm sau 1 tuần cho ăn.

6.2.5. Phát triển probiotic dạng bột

6.2.5.1. Mật độ LAB trong sản phẩm

Nhìn chung mật độ LAB trong các cơ chất bảo quản ở 30°C có xu hướng giảm mạnh.

Bảng 6.2. Biến động mật độ vi khuẩn lactic LAB (CFU/g)

Nghiệm thức	Thời gian bảo quản (ngày)	
	1	21
Lactose 4°C	$1,7 \times 10^{8a}$	$1,3 \times 10^{8a}$
Lactose 30°C	$1,5 \times 10^{8a}$	$8,6 \times 10^{4b}$
Sữa tách béo 4°C	$1,8 \times 10^{8a}$	$1,3 \times 10^{8a}$
Sữa tách béo 30°C	$1,7 \times 10^{8a}$	$3,3 \times 10^{2c}$

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Bột sữa đạt giá trị thấp nhất ($3,3 \times 10^2$ CFU/g), trong khi đó Lactose đạt giá trị tốt nhất ($8,6 \times 10^4$ CFU/g). Ở điều kiện bảo quản ở 4°C, mật độ LAB trong các loại cơ chất không có sự chênh lệch đáng kể ($p > 0,05$). Nhìn chung, mật độ LAB duy trì tốt nhất khi bảo quản ở nhiệt độ 4°C khi sử dụng lactose hoặc bột sữa.



Hình 6.3. Sản phẩm probiotic sau khi đóng gói

6.2.5.2. Hằng số tế bào chết tuyệt đối

Kết quả về mật độ tại thời điểm đôi khi chưa phản ánh đúng vì sự chết đi của vi khuẩn trong sản phẩm diễn ra hàng ngày và kéo dài theo thời gian. Do đó, hằng số chết tuyệt đối được tính theo ngày là một chỉ tiêu rất cần thiết. Tại thời điểm 21 ngày, hằng số tế bào chết khi bảo quản ở 30°C cao nhất là bột sữa ($k=0,272\pm0,01$), kế đến là lactose ($k=0,154\pm0,009$). Tuy nhiên ở điều kiện 4°C thì cả hai loại cơ chất đều có hằng số tế bào chết thấp nhất.

Bảng 6.3. Hằng số tế bào chết tuyệt đối (k /ngày)

Nghiệm thức	Thời gian bảo quản (ngày)	
	1	21
Lactose 4°C	0 ± 0^a	$0,006\pm0,003^c$
Lactose 30°C	0 ± 0^a	$0,154\pm0,009^b$
Sữa tách béo 4°C	0 ± 0^a	$0,006\pm0,002^c$
Sữa tách béo 30°C	0 ± 0^a	$0,272\pm0,01^a$

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$)

6.2.5.3. Hoạt tính enzyme ngoại bào

Hoạt tính protease của lợi khuẩn LAB ở mức bảo quản 4°C và 30°C có sự khác biệt ý nghĩa ($p<0,05$) sau 21 ngày theo dõi.

Bảng 6.4. Hoạt tính protease (U/mL)

Nghiệm thức	Thời gian bảo quản (ngày)	
	1	21
Lactose 4°C	199,3±34,6 ^a	230,1±30,7 ^a
Lactose 30°C	216,8±30,2 ^a	60,1±11,7 ^b
Sữa tách béo 4°C	231,1±37,6 ^a	232,8±28,6 ^a
Sữa tách béo 30°C	220,5±41,7 ^a	28,9±6,4 ^b

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Cụ thể, ở điều kiện bảo quản 4°C hoạt tính protease ở nghiệm thức cơ chất lactose và sữa tách béo dao động trong khoảng 230,1 - 232,8 U/mL, trong khi kết quả ghi nhận ở nhiệt độ 30°C đạt giá trị thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) với hoạt tính dao động từ 28,9 - 60,1 U/mL.

Bảng 6.5. Hoạt tính α -amylase (U/mL)

Nghiệm thức	Thời gian bảo quản (ngày)	
	1	21
Lactose 4°C	110,5±11,4 ^a	91,4±3,5 ^a
Lactose 30°C	114,6±9,9 ^a	14,9±0,7 ^c
Sữa tách béo 4°C	115,9±11,3 ^a	71,2±7,9 ^b
Sữa tách béo 30°C	114,3±12,2 ^a	14,7±2,1 ^c

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Tương tự, hoạt tính α -amylase ở các nghiệm thức cũng có chiều hướng biến động như hoạt tính protease. Ở điều kiện bảo quản 30°C hoạt tính có chiều hướng giảm mạnh và thấp hơn có ý nghĩa sau 21 ngày theo dõi với giá trị dao động trong khoảng 14,7 - 14,9 U/mL, trong khi ở điều

kiện 4°C giúp duy trì ổn định hoạt tính của lợi khuẩn LAB, đặc biệt là nghiệm thức Lactose ($91,4 \pm 3,5$ U/mL).

6.3. KẾT LUẬN

Việc sử dụng qui trình giúp tuyển chọn được các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. tiềm năng với các đặc điểm của một probiotic như sinh hoạt tính kháng khuẩn, enzyme mạnh và đánh giá an toàn trên đối tượng nuôi. Hơn nữa, qui trình cung cấp các bước, phương pháp để đánh giá hiệu quả của các cơ chất để phục vụ cho sản xuất sản phẩm probiotic dạng bột. Với qui trình trên thì hoàn toàn có thể nghiên cứu đối với các nguồn nguyên liệu khác hoặc chủng lợi khuẩn khác để đa dạng hóa sản phẩm.

QUI TRÌNH 7

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

7.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

7.1.1. Thiết bị và hóa chất

Trang thiết bị: Tủ cấy vô trùng (Astec, Anh, Model 50546), tủ ủ (Sanyo, Nhật, Mir 262), tủ đông sâu (-86°C, MDF-U52V), tủ mát (Alaska), nồi hấp tiệt trùng (HVE 50, Nhật), tủ sấy (Memmert, Đức), cân điện tử (Sartorius, Đức, GM 612), kính hiển vi Olympus CX21 (Olympus Optical Co. Ltd., Nhật), máy khuấy từ gia nhiệt HP-3000 (Lab Companion, Hàn Quốc), máy so màu (9423 UVA 1002E, Helios Alpha, England). Micropipete các loại (Đức, Lab System).

Hóa chất: Các loại hóa chất sử dụng trong phòng thí nghiệm với độ tinh khiết cao như Ethanol 98°, Ethanol 70°, Malt extract, Yeast extract, D-glucose, Soluble starch, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, Peptone, Tryptone, Casein, D-Maltose, Sucrose, Glycerol, NaOH, HCl, NaCl, Yeast extract, Malt extract, Agar...

7.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn Nutrient Broth (NB) và Nutrient gar (NA) (Merck, Đức). Môi trường Starch Casein Broth (SCB) gồm 10 g Soluble Starch, 0,3 g Casein, 2 g KNO₃, 0,05 g MgSO₄.7H₂O, 2 g K₂HPO₄, 15 g NaCl, 0,02 g CaCO₃, 0,01 g FeSO₄.7H₂O và 1000 mL nước cất. Môi trường thạch Starch Casein Agar (SCA) gồm các thành phần tương tự môi trường SCB và bổ sung 1,5% agar.

7.1.3. Thu mẫu và xử lý mẫu

Thu mẫu bùn ao tôm bằng bộ dụng cụ PVC (đường kính 49 mm) theo thiết kế đặc biệt dành cho thu mẫu bùn lắng tụ (trầm tích). Hỗn hợp

bùn thu bằng dụng cụ ống PVC sẽ được loại bỏ nước thông qua các lỗ trên thân ống, sau đó thu lớp bùn trên mặt có độ dày 2 - 5 cm vào túi nhựa. Thu mẫu bùn tại 4 - 5 điểm xung quanh ao, sau đó trộn đều các mẫu lại với nhau để đồng nhất mẫu và bảo quản trong thùng lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành xử lý và phân lập.

7.1.4. Phân lập và định danh

Pha loãng 1 gram mẫu bùn ao với nước muối sinh lý tiệt trùng (0,85% NaCl) để đạt nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} và trải trên môi trường đĩa thạch SCA đã được bổ sung nystatin (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và nalidixic acid (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) để hạn chế sự phát triển của nấm và các loài vi khuẩn khác. Ủ đĩa thạch ở 30°C trong 7 ngày. Sau đó, chọn các khuẩn lạc với hình dạng và kích thước khác nhau để tách rông trên môi trường thạch SCA đến khi thu được khuẩn lạc thuần. Sau đó, tiến hành nhuộm Gram và kiểm tra phản ứng với catalase, oxidase. Xác định các đặc điểm sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn dựa theo cẩm nang của Cowan and Steels kết hợp với sử dụng bộ kit API 20E (BioMerieux, France). Các chủng Gram (+) và dương tính với Catalase, Oxidase âm tính, được chọn nuôi tăng sinh và trữ lạnh -80°C với 25% glycerol.

7.1.5. Sàng lọc các chủng có hoạt tính kháng khuẩn

Đánh giá khả năng sinh hoạt tính kháng khuẩn của các chủng phân lập bằng phương pháp cấy vệt vuông góc. Cụ thể, cấy chủng phân lập theo một đường thẳng (rộng khoảng 0,5 cm) vào trung tâm đĩa thạch NA, ủ đĩa ở 30°C trong 7 ngày. Phục hồi vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus* sử dụng trong nghiên cứu phân lập từ tôm bị bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên môi trường NA (bổ sung 1% NaCl). Sau đó cấy chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thành một đường vuông góc 90° với vệt cấy của khuẩn phân lập. Quan sát khả năng đối kháng sau 24 giờ ở 30°C bằng cách đo đường vô trùng giữa chủng phân lập với các chủng vi khuẩn *Vibrio*. Mức độ kháng được đánh giá thông qua đường kính vòng vô trùng so với tiêu chuẩn (Kháng: ≤ 9 mm; Trung bình: $\geq 10 - 13$ mm; Nhạy: ≥ 14 mm).

7.1.6. Đánh giá hoạt tính enzym ngoại bào

Chọn các chủng phân lập có tiềm năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* để đánh giá hoạt tính enzym ngoại bào.

a. Hoạt tính protease: Nuôi các chủng phân lập trong môi trường khoáng cơ bản (bao gồm 0,5 g glucose; 0,6 g KNO₃; 10 g peptone; 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 10g NaCl; 1 g CaCl₂.2H₂O, 0,5 g K₂HPO₄ và 1000 mL nước cất) bổ sung 1% casein. Sau 7 ngày nuôi ở 30°C tiến hành thu dịch nổi bằng phương pháp ly tâm ở vận tốc 8.500 vòng trong 10 phút ở 4°C và xác định hoạt tính enzym protease theo các bước như sau: 100 µL dịch nổi ủ với 100 µL dung dịch 1% casein (pha trong dung dịch đệm Tris-HCl, pH 7,0) trong 10 phút ở 37°C và 500 µL dung dịch 5% Trichloroacetic acid được thêm vào để ngừng phản ứng. Sau 20 phút, hỗn hợp trên được ly tâm ở tốc độ 3.000 rpm trong 10 phút ở 4°C và thu phần dịch nổi bên trên để xác định hoạt tính enzym. Một unit (U) enzym tương ứng với lượng enzym phóng thích 1 µg tyrosine ở cùng điều kiện chuẩn.

b. Hoạt tính α-amylase: Dịch nổi của các chủng xạ khuẩn sau 7 ngày nuôi trong môi trường sinh tổng hợp amylase bao gồm 6 g bacteriological peptone; 0,5g MgSO₄.7H₂O; 0,5 g KCl; 10 g NaCl, 1g soluble starch và 1000 mL nước cất. Xác định hoạt tính α-amylase theo các bước như sau: phản ứng gồm 100 µL dịch enzym vi khuẩn ủ với 100 µL dung dịch 1% soluble starch (pha trong dung dịch đệm NaH₂PO₄ 20 mM và NaCl 6,7 mM) trong ống nghiệm thủy tinh ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, phản ứng sẽ tạo màu với 200 µL dung dịch thuốc thử DNS và xử lý nhiệt ở 100°C trong 5 phút. Các ống nghiệm được làm lạnh và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Nồng độ enzym phóng thích 1 µmol maltose ở cùng điều kiện chuẩn được xác định như một unit enzym amylase.

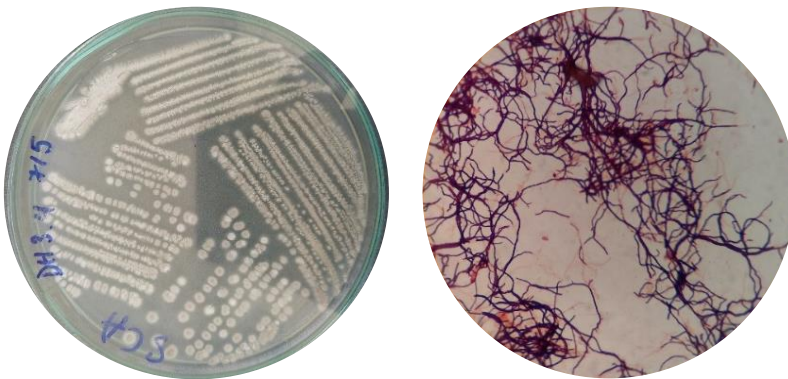
c. Hoạt tính cellulase: Nuôi vi khuẩn trong môi trường khoáng cơ bản (gồm 1g KCl; 1 g NaNO₃; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,5 g yeast extract; 10 g NaCl và 1000 mL nước cất) bổ sung 1% Sodium carboxymethyl cellulose (Na-CMC). Sau 7 ngày nuôi, thu dịch nổi bằng

phương pháp ly tâm để xác định hoạt tính enzym. Phương pháp thực hiện như sau: 0,5 mL dung dịch 1% Sodium carboxymethyl cellulose (được chuẩn bị trong dung dịch đệm Citrate 0,05 M; pH 5,0) và 0,5 mL dịch enzym vi khuẩn được ủ ở 50°C trong 30 phút, sau đó thêm 1,5 mL dung dịch thuốc thử DNS vào phản ứng và đun nóng 100°C trong 10 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm bằng phương pháp so màu quang phổ. Một đơn vị (U) enzym được xác định như lượng enzym phóng thích 1 μmol glucose ở cùng điều kiện chuẩn.

7.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

7.2.1. Phân lập và đặc điểm nhận dạng

Tổng cộng 162 chủng xạ khuẩn được ghi nhận phát triển trên môi trường SCA sau 7 ngày nuôi với các đặc điểm hình thái như kích thước khuẩn lạc dao động 1,1 - 2,8 mm, rìa không đều, màu sắc đa dạng từ màu trắng phấn (55%), xám (19%), vàng (14,2%), nâu (6,2%), đỏ (5,6%). Tổng cộng 54 chủng có đặc điểm nhận dạng tương đồng với giống *Streptomyces* sp.



Hình 7.1. Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường SCA (trái) và tế bào nhuộm gram (phải) của xạ khuẩn

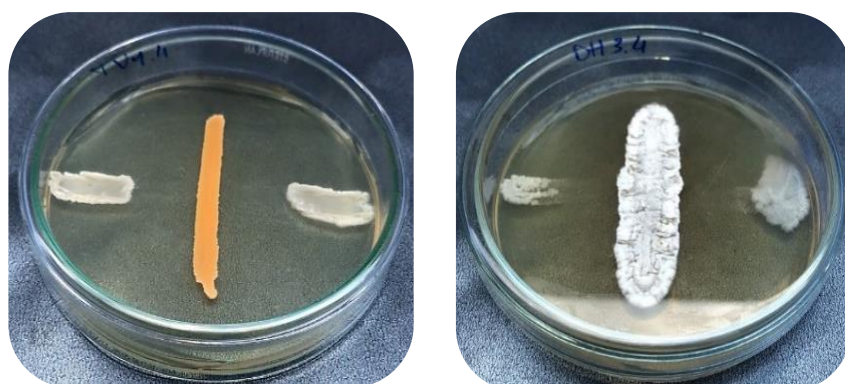
Kết quả kiểm tra sinh hóa cho thấy 54 chủng thuộc gram dương, dương tính với catalase, âm tính với oxidase và có khả năng hình thành bào tử. Hầu hết tế bào có dạng hình chuỗi sợi dài (87%), một số hình que và hình cầu (13%). Các chủng phân lập có khả năng phát triển ở ngưỡng pH từ 4 - 11 và ở nồng độ muối lên đến 5% NaCl.

7.2.2. Khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Trong số 54 chủng thì chủng TV4.1 và DH3.4 thể hiện khả năng kháng mạnh với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* khi đánh giá bằng phương pháp cấy vệt vuông góc.

Bảng 7.1. Đường kính vòng kháng khuẩn của các chủng phân lập

STT	Chủng	Đường kính vòng kháng (mm)
1	CM2.4	14,3±0,58
2	DH3.4	24,8±0,76
3	TV1.4	32,8±1,04



Hình 7.2. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn với *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp cấy vệt vuông góc

7.2.3. Hoạt tính enzym ngoại bào

Khả năng sinh enzym ngoại bào của các chủng xạ khuẩn có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$). Theo đó, chủng TV1.4 thể hiện hoạt tính enzym protease vượt trội nhất, nhưng hoạt tính α -amylase và cellulase thấp nhất. Trong khi đó chủng DH3.4 không chỉ có hoạt tính protease cao, khác biệt không ý nghĩa so với chủng TV1.4 mà còn sinh hoạt tính α -amylase và cellulase cao. So với 2 chủng trên, mặc dù chủng CM2.4 có hoạt tính amylase và cellulase cao nhưng hoạt tính protease thấp nhất.

Bảng 7.2. Hoạt tính enzym của xạ khuẩn (U/mL)

Hoạt tính (U/mL)	Chủng khuẩn		
	CM2.4	DH3.4	TV1.4
Protease	96,1±10,2 ^b	174,9±8,5 ^a	183,9±10,5 ^a
α-amylase	193,4±14,5 ^b	262,7±20,6 ^a	96,2±23,5 ^c
Cellulase	119±7,6 ^a	84±7,7 ^b	7±0,8 ^c

Ghi chú: các giá trị trong cùng một hàng có ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

7.3. KẾT LUẬN

Việc áp dụng qui trình giúp tìm được các chủng xạ khuẩn có nguồn gốc bản địa có các đặc tính kháng khuẩn và hoạt tính enzym vượt trội. Từ đó, các chủng tiềm năng này sẽ được đánh giá và kiểm tra mức độ an toàn trên các đối tượng nuôi trong *in vivo* trước khi ứng dụng vào thực tiễn tạo tiền đề cho việc phát triển các dòng vi khuẩn tiềm năng thay thế cho các sản phẩm probiotic được nhập khẩu từ nước ngoài.

QUI TRÌNH 8

PHÂN LẬP, SÀNG LỌC VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA VI KHUẨN CHUYỂN HÓA LƯU HUỖNH PHỤC VỤ NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

8.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

8.1.1. Trang thiết bị và hóa chất

Trang thiết bị: Tủ cấy vô trùng (Astec, Anh, Model 50546), tủ ủ (Sanyo, Nhật, Mir 262), tủ đông sâu (-86°C , MDF-U52V), tủ mát (Alaska), Máy lắc mẫu Vortex (Velp, Ý), nồi hấp tiệt trùng (HVE 50, Nhật), tủ sấy (Menmert, Đức), cân điện tử (Sartorius, Đức, GM 612), kính hiển vi Olympus CX21 (Olympus Optical Co. Ltd., Nhật), Micropipete các loại (Đức, Lab System), ống nghiệm 15 mL, ống nhựa PVC thu mẫu bùn đáy.

Hóa chất: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; NH_4Cl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , H_2O_2 , $\text{C}_{25}\text{N}_3\text{H}_3\text{OCl}$ (Crystal Violet), $\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, glycerol, NaOH , HCl , ethanol, $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClN}_4$ (Safranin), $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot 2\text{HCl}$ (Tetramethyl-*p*-Phenylendiamin dihydrochlorid, TMPD) và nước cất.

8.1.2. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Môi trường TSM: Hòa tan 1,5 g K_2HPO_4 , 1,5 g KH_2PO_4 , 0,4g NH_4Cl , 0,8 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trong 1000 mL nước cất. Nếu chuẩn bị đĩa thạch thì bổ sung 1,5% agar vào môi trường.

8.1.3. Thu mẫu và xử lý mẫu

Thu mẫu bùn ở tầng trên cùng có độ dày 3 cm một cách nhẹ nhàng bằng dụng cụ đặc biệt được thiết kế bằng vật liệu nhựa PVC, đường kính 49 mm. Tham khảo thiết kế của Somsiri et al. (2006). Mỗi ao thu 5 điểm, sau đó trộn đều để đồng nhất mẫu và thu khoảng 20 - 30 g bùn, bảo quản

lạnh 4°C, vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập, sàng lọc, đánh giá hoạt tính càng sớm càng tốt.



Hình 8.1. Thu mẫu bùn đáy ao

8.1.4. Tăng sinh và phân lập

Do mật độ vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh trong mẫu có thể thấp, do đó cần nuôi tăng sinh quần thể trước khi phân lập. Cho 1 g mẫu bùn vào 20 mL môi trường TSM (1,5 g K_2HPO_4 , 1,5 g KH_2PO_4 , 0,4g NH_4Cl , 0,8 g $MgCl_2.6H_2O$, 0,1 g $CaCl_2.2H_2O$, 10 g $Na_2S_2O_3.5H_2O$, 0,01 g $FeSO_4.7H_2O$ trong 1000 mL nước cất) có bổ sung 1% NaCl trong bình Erlenmeyer 100 mL và lắc với vận tốc 160 vòng/phút ở 28°C để nuôi tăng sinh mật độ vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh. Sau 7 ngày nuôi, tiến hành pha loãng mẫu với nước muối sinh lý tiệt trùng (0,9% NaCl) như sau: hút lần lượt 1 mL dung dịch mẫu bằng micropipette vào các ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý, sau đó lắc đều mẫu bằng máy vortex được dung dịch có độ pha loãng 10^{-1} . Tiếp tục hút chuyển 1 mL dung dịch ở độ pha loãng 10^{-1} vào ống nước muối khác và lắc đều mẫu, dung dịch sẽ có độ pha loãng 10^{-2} . Thao tác trên được lặp lại cho đến khi đạt được dung dịch có độ pha loãng cao hơn. Trải 0,1 mL dung dịch mẫu ở các độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} trên môi trường đĩa thạch TSM bằng phương pháp cấy trải, ủ 28°C trong 7 ngày. Sau đó, các khuẩn lạc có màu sắc và hình thái khác nhau được chọn để tách ròng 2-3 lần cho đến khi thu được khuẩn lạc thuần trên môi trường thạch TSM và bảo quản trong môi trường lỏng TSM ở -80°C có bổ sung glycerol 20% cho các đánh giá tiếp theo.

8.1.5. Định danh vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh

Các chủng vi khuẩn được nhận dạng trước hết dựa vào hình dạng khuẩn lạc, hình thái (hình dạng: cầu, que ngắn, que dài... khả năng tạo bào tử, di động), nhuộm Gram, phân tích đặc điểm sinh hóa: khả năng tạo catalase, oxidase, pH độ mặn và nhiệt độ thích hợp, khả năng sinh H_2S , khả năng sử dụng đường glucose, khả năng sử dụng thiosulfide như là nguồn năng lượng, hoạt tính enzyme sulfur-oxidase.

8.1.5.1. Phân lập vi khuẩn

Nuôi cấy khuẩn lạc thuần của các chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường đĩa thạch TSM trong môi trường dinh dưỡng TSM có bổ sung Bromocresol purple (0,01 g/L) như chất chỉ thị pH và ủ ở 28°C trên máy lắc ở tốc độ 160 vòng/phút. Sau 7 ngày nuôi, ghi nhận màu sắc của môi trường TSM để chọn lọc các chủng vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh tiềm năng dựa trên khả năng oxy hóa thiosulfide thành ion sulfate làm giảm pH của môi trường (chuyển màu môi trường từ tím sang vàng).

Đánh giá mỗi chủng vi khuẩn phân lập ba lần lặp lại trong ống nghiệm chứa môi trường TSM để xác nhận khả năng chuyển hóa lưu huỳnh.

8.1.5.2. Đặc điểm hình thái tế bào

Quan sát quá trình này dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000 lần thông qua nhuộm Gram. Phương pháp đánh giá như sau: dùng que cấy vô trùng lấy 1 ít khuẩn lạc đã tách rỗng hòa vào giọt nước muối sinh lý đã tiệt trùng ở giữa phiến kính, để khô trong phòng thí nghiệm. Cố định tiêu bản bằng cách hơi nhanh trên ngọn lửa đèn cồn 2 - 3 lần để gắn chặt vi khuẩn vào phiến kính. Sau đó tiến hành nhuộm với dung dịch tím tinh thể (Crystal Violet) trong 1 phút, rửa lại bằng nước cất. Nhuộm tiếp bằng dung dịch Lugol trong 1 phút, rửa bằng nước cất. Nhuộm tiếp bằng dung dịch Lugol trong 1 phút, rửa bằng nước cất. Nhỏ 1 - 2 giọt dung dịch Alcohol 95% cho đến khi mất màu, rửa lại bằng nước cất. Sau đó nhuộm tiếp dung dịch Safranin trong 1 phút, rửa nước cất, để khô. Quan sát với giọt dầu ở vật kính 100X.

Nếu nhuộm đúng vi khuẩn Gram dương bắt màu tím, Gram âm bắt màu hồng. Bên cạnh đó, nhuộm Gram có thể xác định lại bằng phương pháp KOH. Nhỏ vài giọt KOH 3% vào vi khuẩn đã tách ròn, nếu thấy hiện tượng hỗn hợp trở nên sánh đặc hoặc tạo gel thì kết luận vi khuẩn Gram âm, ngược lại nếu không có hiện tượng trên thì kết luận vi khuẩn Gram dương.

8.1.5.3. Đặc điểm sinh hóa

Phản ứng catalase: Dùng que cấy vô trùng lấy một ít khuẩn lạc phết lên lam kính, sau đó nhỏ một giọt dung dịch H₂O₂ (3%) lên lame. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính với Catalase sẽ có hiện tượng sủi bọt khí và ngược lại.

Phản ứng oxidase: Phết một ít vi khuẩn lên đĩa giấy đã tẩm dung dịch Tetramethyl-*p*-Phenylendiamin dihydrochlorid (1%) bằng que cấy vô trùng. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính sẽ làm giấy chuyển sang màu đen và ngược lại.

Tính di động: Được kiểm tra trên môi trường TSM bổ sung 0,4% agar. Sử dụng que cấy đầu kim vô trùng lấy 1 ít khuẩn lạc thuần của vi khuẩn tiềm năng ở giai đoạn pha tăng trưởng, cấy đâm sâu khoảng 1/2 vào giữa khối thạch TSM (bổ sung 0,4% agar). Tính di động của vi khuẩn được xác định sau 7 ngày nuôi ở 28°C dựa vào sự hiện diện của vi khuẩn trong đường nuôi cấy và trên bề mặt khối thạch TSM.

Bên cạnh đó, các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa được nhận dạng dựa theo cẩm nang của Cowan and Steels (Barrow & Feltham, 1993) kết hợp với sử dụng bộ kit thương mại API 20E (BioMerieux, Pháp). Một số đặc điểm sinh hóa điển hình của chủng vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh như hình que, Gram âm, phản ứng catalase dương tính, phản ứng oxidase âm tính, không di động, không tạo bào tử, không tạo H₂S và không cần đường glucose.

Bảng 8.1. Một số đặc điểm của các giống vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh tham khảo

Giống	Hóa tự dưỡng bắt buộc	Nhiệt độ (°C)	pH	Quang hợp
<i>Thiobacillus</i>	+	28-43	6,8-8,0	-
<i>Acidiphilium</i>	-	25-37	3,3-3,5	+
<i>Acidithiobacillus</i>	+	30-45	2,0-3,5	-
<i>Halothiobacillus</i>	+	28-30	6,5-8,0	-
<i>Paracoccus</i>	-	25-37	6,5-9,0	-
<i>Starkeya</i>	-	25-30	7,0	-
<i>Thermithiobacillus</i>	+	43-45	6,8-7,5	-
<i>Thiomonas</i>	-	30-50	5,2-6,0	-

(Nguồn: Kelly et al., 2005)

8.1.6. Đánh giá khả năng hình thành SO_4^{2-}

Xác định hàm lượng ion sulfate (SO_4^{2-}) hình thành trong quá trình phát triển của vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh trên môi trường TSM bằng phương pháp chuẩn APHA (2017). Cụ thể, nuôi các chủng vi khuẩn được cho là có tiềm năng chuyển hóa sulfide trong môi trường TSM ở 28°C trên máy lắc với tốc độ 160 vòng/phút. Sau 7 ngày nuôi, ly tâm huyền phù vi khuẩn nuôi trong môi trường TSM ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C để tách phần dịch nổi phía trên (Cell-free supernatant, CFS) và sinh khối tế bào phía dưới. Lọc phần dịch nổi CFS qua giấy lọc Cenzuloz Acetate (Whatman, Anh) với kích thước lỗ lọc 0,2 μm trước khi xác định nồng độ SO_4^{2-} bằng phương pháp 4500- SO_4^{2-} E ở bước sóng 420 nm (APHA, 2017) sử dụng cuvet 1 cm. Thu phần sinh khối tế bào và rửa hai lần bằng nước muối sinh lý tiệt trùng (0,9% NaCl), sau đó điều chỉnh mật độ quang OD_{600} trước khi phân tích hoạt tính oxy hóa sulfide (S^{2-}). Đánh giá chủng vi khuẩn ba lần lặp lại để lấy giá trị trung bình.

8.1.7. Đánh giá hoạt tính enzyme oxy hóa S²⁻

Đánh giá hoạt tính enzyme oxy hóa sulfide thành sulfate của các chủng vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh theo qui trình như sau: chuẩn bị dung dịch phản ứng gồm 4,5 mL dung dịch đệm Sodium acetate 0,1M (pH 5,6) và 1 mL huyền phù tế bào vi khuẩn như phương pháp mô tả ở trên, sau đó thêm 0,5 mL dung dịch sodium sulfide (0,06 g Na₂S, 0,16g NaOH, 0,02 g EDTA Na₂. 2H₂O, 2 mL glycerol và 40 mL nước cất). Hỗn hợp dung dịch trên ủ ở 30°C trong 30 phút và phản ứng kết thúc sau khi thêm 1,5 mL dung dịch NaOH 1M.

Xác định nồng độ SO₄²⁻ hình thành trong quá trình oxy hóa sulfide bằng phương pháp đo độ đục (APHA, 2017). Xác định hoạt tính oxy hóa sulfide như lượng enzyme cần thiết để tạo ra 1 μmol sulfate/giờ/mL. Sử dụng dung dịch nước muối sinh lý tiệt trùng (0,9% NaCl) làm mẫu đối chứng với tỉ lệ tương tự huyền phù tế bào vi khuẩn. Tính hoạt tính enzyme oxy hóa sulfide (E) theo công thức sau:

$$E \text{ (U/giờ/mL)} = \frac{(\text{Sulfate}_{\text{SOB}} - \text{Sulfate}_{\text{Control}}) \times 1000}{0,5 \times 6 \text{ mL}}$$

8.1.8. Khả năng xử lý S²⁻ trong nước ao nuôi

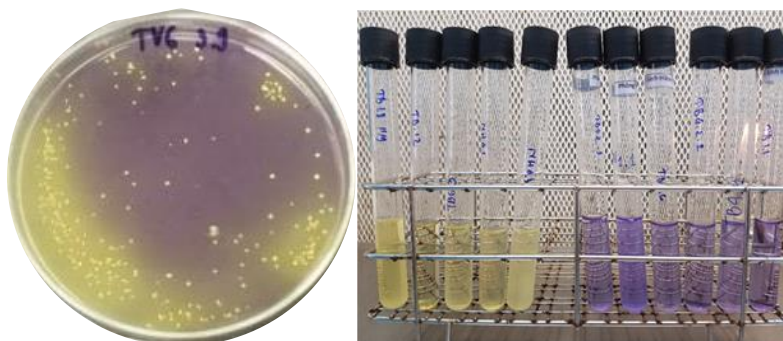
Thu nước thải từ bể nuôi tôm siêu thâm canh và vận chuyển về phòng thí nghiệm để thí nghiệm. Bố trí nước với dung tích 5 lít, sục khí nhẹ, duy trì pH ở mức 7,5-8,5. Bổ sung vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh vào với mật độ 10², 10³ và 10⁴ CFU/mL. Bể không bổ sung vi khuẩn được xem như đối chứng. Theo dõi các chỉ tiêu pH, S²⁻, H₂S, SO₄²⁻ liên tục ở các thời gian 0, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 1440, 2880 phút. Đánh giá hiệu quả của việc bổ sung vi khuẩn thông qua so sánh với đối chứng.

8.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

8.2.1. Thu mẫu và phân lập

Kết quả nghiên cứu tại 12 ao thu mẫu tại Trà Vinh thu được 17 chủng phát triển trên môi trường TSM. Hầu hết các chủng này có hình thái khuẩn lạc tròn nhỏ, trắng đục, bề mặt lồi, bìa phẳng với đường kính dao động từ 0,5 đến 2,5 mm. Sau quá trình sàng lọc, thu được 03 chủng

có khả năng chuyển hóa sulfur và làm giảm pH và đổi màu của bromocresol purple trong môi trường thạch TSM. Điều này cũng được xác nhận lại trong môi trường TSM lỏng. Kết quả nhuộm Gram, đánh giá đặc điểm sinh hóa, khả năng di động và hình thành bào tử được thể hiện qua Bảng 8.2.



Hình 8.2. Sự thay đổi màu của môi trường TSM thạch và lỏng

Bảng 8.2. Đặc điểm hình thái và sinh hóa các chủng vi khuẩn chuyển hóa lưu huỳnh

STT	Chủng	Hình dạng tế bào	Gram	Catalase	Oxidase	Di động	Hình thành bào tử
1	TV4.1	Que	-	+	-	-	-
2	TV5.1	Que	-	-	-	-	-
3	TV6	Que	-	-	-	-	-

Ghi chú: (+) là dương tính ; (-) là âm tính. Kết quả được trích từ kết quả nghiên cứu của Chương trình nghiên cứu F5.

8.2.2. Kết quả đánh giá khả năng hình thành SO_4^{2-}

Các chủng vi khuẩn được tiến hành đánh giá khả năng hình thành ion sulfate trong quá trình phát triển để so sánh hiệu quả chuyển hoá lưu huỳnh. Sau 7 ngày nuôi trong môi trường TSM lỏng, kết quả chủng

TV5.1 được ghi nhận là có hàm lượng ion sulfate cao nhất (348,3 mg/mL) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với những chủng còn lại. Bên cạnh đó, pH của chủng TV5.1 đạt thấp nhất (2,05), 2 chủng còn lại dao động từ 6,55 - 6,80.

Bảng 8.3. Hàm lượng sulfate (SO_4^{2-}) và pH sau 168 giờ

Chủng	pH_{đầu}	pH_{cuối}	SO_4^{2-} (mg/L)
TV4.1	7	6,80	85,69±22,3 ^a
TV5.1	7	2,05	348,3±36,3 ^b
TV6	7	6,55	105,9±14,7 ^a

Ghi chú: Giá trị có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$)

8.2.3. Đánh giá hoạt tính enzyme oxy hóa sulfide

Sau 30 phút phản ứng, nồng độ ion sulfate hình thành được xác định để đánh giá hoạt tính oxy hóa sulfide của các chủng vi khuẩn chọn lọc. Chủng TV5.1 có hoạt tính oxy hóa sulfide cao nhất (5329 ± 353 U/mL/giờ), khác biệt đối với các chủng còn lại mang ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các chủng còn lại.

Bảng 8.4. Hoạt tính enzyme oxy hoá sulfide

Chủng	Hoạt tính (U/mL)
TV4.1	3.998±180 ^{ab}
TV5.1	5.329±353 ^c
TV6	3.122±163 ^{ab}

Ghi chú: Giá trị có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$)

8.3. KẾT LUẬN

Qui trình đã phân lập và sàng lọc được hoạt tính của các chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa lưu huỳnh từ dạng S^{2-} thành SO_4^{2-} . Phương pháp trình bày rõ ràng, dễ thực hiện. Sau quá trình sàng lọc có thể lựa chọn được những chủng có những hoạt tính khác nhau. Do đó, với qui trình trên thì hoàn toàn có thể nghiên cứu để thu thập được các chủng phong phú hơn và tùy theo mục tiêu ứng dụng khác nhau.

QUI TRÌNH 9
SÀNG LỌC CÁC HỖN HỢP LY TRÍCH TỪ
SẢN PHẨM TỰ NHIÊN CÓ HOẠT TÍNH PREBIOTIC
ĐỂ PHÁT TRIỂN SYNBIOTIC CHO
TÔM *Litopenaeus vannamei*

9.1. QUI TRÌNH KỸ THUẬT

9.1.1. Thiết bị và hóa chất

Trang thiết bị: Tủ cấy vô trùng (Astec, Anh, Model 50546), tủ ủ (Sanyo, Nhật, Mir 262), tủ đông sâu (-86°C, MDF-U52V), tủ mát (Alaska), nồi hấp tiệt trùng (HVE 50, Nhật), tủ sấy (Memmert, Đức), cân điện tử (Sartorius, Đức, GM 612), máy ly tâm (Rotina 35, Đức), máy khuấy từ gia nhiệt HP-3000 (Lab Companion, Hàn Quốc), máy so màu (9423 UVA 1002E, Helios Alpha, England). Micropipete các loại (Đức, Lab System).

Hóa chất: Sử dụng trong phòng thí nghiệm với độ tinh khiết cao như Ethanol 98°, Ethanol 70°, Casein, Tris-HCl, Trichloroacetic acid, Tryptone, Proteose peptone Số.3, Beef extract, Yeast extract, Polysorbate 80, Ammonium citrate, Magnesium sulfate, Manganese sulfate, Glucose, L-Cystein, Agar, Bromcresol tím, sodium chloride, dipotassium hydrogen phosphate...

9.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường chọn lọc nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus* De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth, MRS agar (HiMedia Laboratories, Ấn Độ); môi trường Thiosulphate Citrate Bile-Salt Sucrose (TCBS) agar.

9.1.3. Chuẩn bị hỗn hợp dịch chiết prebiotic

Chiết xuất các nguồn prebiotic thô có nguồn gốc từ tự nhiên từ một số loại trái cây và rau củ phổ biến ở ĐBSCL, bao gồm các giống chuối cau, chuối xiêm (*Musa acuminata*), khoai lang ruột vàng (*Ipomoea batatas*), và giống khoai lang ruột trắng (*Ipomoea batatas*).

Đối với các loại chuối, qui trình chiết tách dựa trên phương pháp được mô tả trước đây bởi Boonmee and Rengpipate (2015). Gọt vỏ và cắt mỏng chuối. Nghiền 10 gam chuối thái lát trong 100 mL nước 100°C và sau đó chờ trong 10 phút. Lọc chất nổi trên bề mặt qua giấy lọc Whatman (Đức) có kích thước lỗ lọc 0,2 μm và ly tâm ở 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút và sau đó thu dung dịch trong suốt và sấy đông khô cho đến khi thành dạng bột. Đối với các loại khoai lang, hấp 500 g khoai lang ở 100°C trong 30 phút. Sau đó, sấy khô ở 55°C trong 18 giờ. Tiếp theo, nghiền và rây qua lưới cho đến khi hỗn hợp được nghiền thành bột.

Sau đó, lấy 10 g tinh bột khoai lang hòa tan trong 100 mL ethanol 70%, khuấy trong 15 giờ ở nhiệt độ phòng. Lọc hỗn hợp qua giấy lọc thủy tinh GF và ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tạp chất. Sau đó tiếp tục sấy hỗn hợp và cô quay để loại hoàn toàn ethanol và tiến hành sấy đông khô thành dạng bột sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo (Marlida et al., 2014). Để đạt được lượng dịch chiết lớn để thực hiện thí nghiệm, cần chuẩn bị lượng dịch chiết và sản phẩm bột của dịch chiết prebiotic và giữ lạnh ở 4°C cho thí nghiệm về sau.

9.1.4. Phương pháp đánh khả năng tiêu hóa các bột prebiotic của chủng probiotic *Lactobacillus* TV32

Có thể đánh giá khả năng tiêu hóa, sử dụng những hỗn hợp chiết như là nguồn carbon cho sự lên men lactic. Nuôi tăng sinh chủng LAB TV32 trong môi trường MRS Broth ở 37°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm vi khuẩn 3.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Rửa vi khuẩn 2 lần bằng nước muối sinh lý (0,85%) sau đó cho vào dung dịch MRS cải tiến (kí hiệu *m*-MRS) không chứa đường (Bảng 9.1).

Bảng 9.1. Thành phần môi trường MRS cải tiến (g/100 mL)

Nguyên liệu	<i>m</i> -MRS-Glucose ^{††}	<i>m</i> -MRS-không đường [†]	<i>m</i> -MRS-bột prebiotic
<i>m</i> -MRS broth			
Proteose peptone Số.3	1	1	1
Beef extract	1	1	1
Yeast extract	0,5	0,5	0,5
Polysorbate 80	0,1	0,1	0,1
Ammonium citrate	0,2	0,2	0,2
Magnesium sulfate	0,01	0,01	0,01
Manganese sulfate	0,005	0,005	0,005
Dipotassium phosphate	0,2	0,2	0,2
Glucose	2		
Bột prebiotic*			2
<i>m</i> -MRS agar bao gồm những thành phần trên và:			
L-Cystein		0,1	
Agar	1,5	1,5	1,5
Bromcresol tím	0,003	0,003	0,003

Ghi chú: thành phần nguyên liệu của môi trường MRS cải tiến (m-MRS) dựa theo công thức của nhà sản xuất Difco, Laboratories. Các ký hiệu thể hiện đối chứng âm (†), đối chứng dương (††) và () ứng với các chất chiết xuất prebiotic khác nhau. Thành phần tham khảo từ Huynh et al. (2018).*

Cây dung dịch vi khuẩn lên đĩa thạch m-MRS có chứa 2% sản phẩm prebiotic thô với chất chỉ thị Bromcresol tím. Khả năng tiêu

hóa prebiotic bởi lợi khuẩn được xác nhận khi có sự thay đổi màu quanh khuẩn lạc từ màu tím sang vàng.

9.1.5. Đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng của lợi khuẩn *Lactobacillus* TV32 bởi prebiotic

Chuẩn bị dung dịch lợi khuẩn như mô tả ở phần trên. Bổ sung 5 mL dung dịch lợi khuẩn vào 95 mL môi trường *m*-MRS (như Bảng 9.1). Sau đó chuyển dung dịch vi khuẩn qua các ống nghiệm 15 mL. Sự phát triển của lợi khuẩn được theo dõi thông qua độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm tại các thời điểm 0, 6, 12, 24 giờ sử dụng máy so màu quang phổ 2 chùm tia (Helios Alpha, Thermo Fisher Scientific, Anh). Theo dõi pH xuyên suốt quá trình như là một trong những chỉ tiêu gián tiếp phản ánh sự tăng trưởng và tiêu hóa chất prebiotic thô. Đo mẫu 3 lần.

9.1.6. Phương pháp đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng vi khuẩn gây bệnh bởi các prebiotic

Bên cạnh khả năng kích thích tăng trưởng đối với lợi khuẩn thì các prebiotic được sử dụng để kiểm tra trên các dòng vi khuẩn gây bệnh như *V. parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi*. Phương pháp tiến hành như mô tả ở mục 9.1.5. Tuy nhiên phải thay đổi môi trường nuôi cấy phù hợp đối với vi khuẩn gây bệnh. Nuôi cấy vi khuẩn gây bệnh bằng môi trường VM chứa 1,7% tryptone, 2% sodium chloride, 0,25% dipotassium hydrogen phosphate, và 2% prebiotic ở 28°C. Môi trường chứa đường glucose được xem là đối chứng dương, trong khi không bổ sung đường thì được xem là đối chứng âm. Theo dõi tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh thông qua đo đặc độ hấp thụ quang OD 600nm ở các thời điểm 0, 2, 6, 12, 24, 36 và 48 giờ.

9.1.7. Đánh giá chỉ số prebiotic

Chỉ số prebiotic phản ánh khả năng của một hỗn hợp oligosaccharide giúp cho lợi khuẩn probiotic phát triển vượt trội hơn so với các nhóm vi khuẩn khác trong đường ruột của tôm và so với khi sử dụng glucose như là một dạng đường cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn lactic. Carbohydrate có chỉ số prebiotic dương khi

(1) được sử dụng tốt như là glucose bởi lợi khuẩn, và (2) được tiêu hóa đặc hiệu bởi lợi khuẩn, nhưng hạn chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, nghĩa là chúng phải kích thích tăng trưởng của lợi khuẩn hơn là vi khuẩn gây bệnh. Chỉ số prebiotic âm khi tăng trưởng của chủng lợi khuẩn thấp hơn so với môi trường bổ sung glucose hoặc kém hơn sự tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh. Nuôi tăng sinh Probiotic LAB TV32 trong môi trường *m*-MRS có bổ sung 2% glucose hoặc 2% prebiotic xem như là nguồn carbon. Ghi nhận giá trị OD lúc 0 giờ và 24 giờ, sau đó chỉ số prebiotic được tính toán dựa vào công thức của Huynh et al. (2018). Lặp lại mỗi nghiệm thức 3 lần.

9.1.8. Phương pháp đánh giá hoạt tính protease tiết ra bởi lợi khuẩn nuôi trong môi trường bổ sung prebiotic

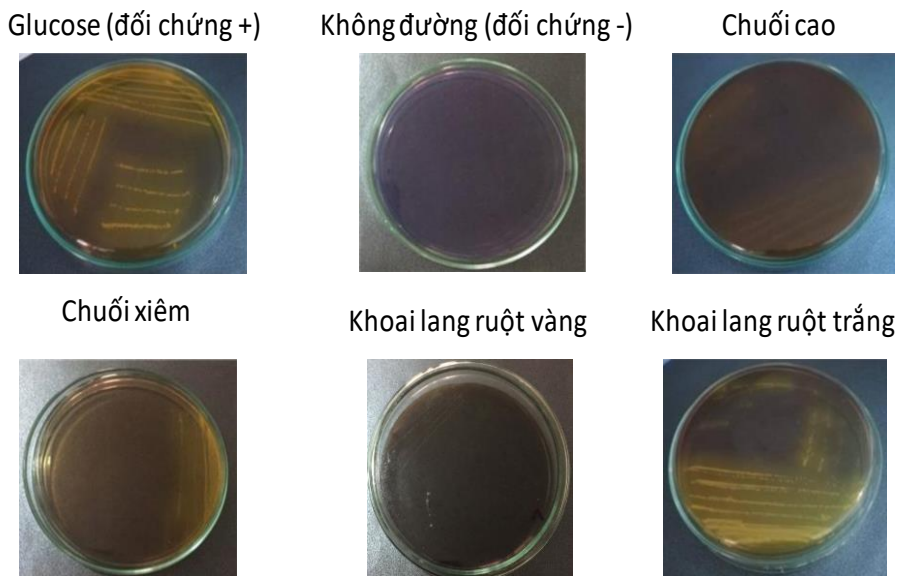
Nuôi tăng sinh chủng lợi khuẩn LAB TV32 trong môi trường *m*-MRS cải tiến bổ sung 2% prebiotic. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường chứa đường glucose được xem như là đối chứng dương. Sau 24 giờ nuôi tăng sinh, ly tâm hỗn hợp để loại bỏ tế bào vi khuẩn và sử dụng dung dịch để phân tích hoạt tính enzyme protease theo các bước như sau: ủ 100 μ L dịch CFS với 100 μ L dung dịch 1% casein (pha trong dung dịch đệm Tris-HCl, pH 7,0) trong 10 phút ở 37°C và thêm 500 μ L dung dịch 5% Trichloroacetic acid vào để ngừng phản ứng. Sau 20 phút, ly tâm hỗn hợp trên ở tốc độ 3.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và thu phần dịch nổi phía trên để xác định hoạt tính enzyme theo phương pháp Lowry et al. (1951). Một unit (U) enzym tương ứng với lượng enzym phóng thích 1 μ g tyrosine ở cùng điều kiện (Huynh et al., 2018).

9.2. KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM QUI TRÌNH

9.2.1. Khả năng tiêu hóa prebiotic của chủng LAB TV32

Sau 48 giờ theo dõi, các đĩa thạch môi trường *m*-MRS chứa bột prebiotic ly trích từ chuối và khoai có sự hiện diện khuẩn lạc của lợi khuẩn LAB TV32 (Hình 9.1). Kết quả này cho thấy các prebiotic thí

nghiệm được lợi khuẩn sử dụng như nguồn carbon cho quá trình lên men.



Hình 9.1. Khả năng sử dụng prebiotic bởi lợi khuẩn *Lactobacillus* TV32 sau 24 giờ

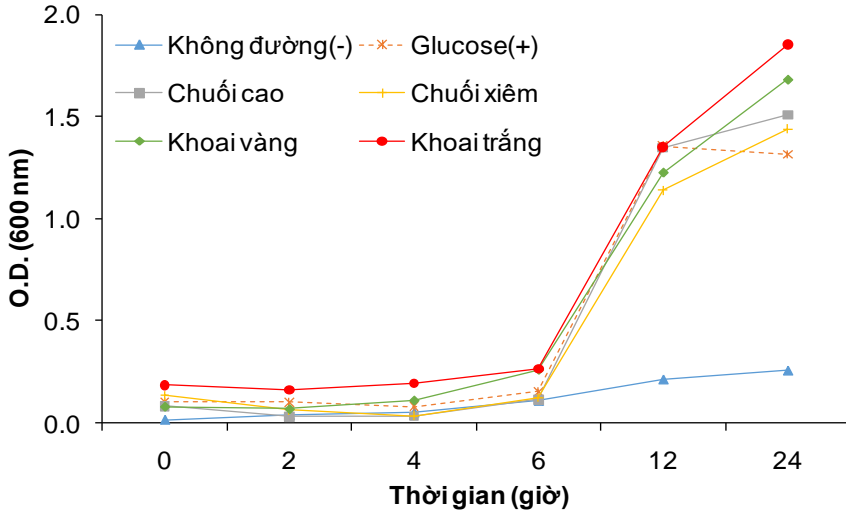
9.2.2. Kích thích tăng trưởng của lợi khuẩn *Lactobacillus* TV32 bởi prebiotic

Kết quả thống kê cho thấy tăng trưởng của lợi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa khi nuôi trong môi trường chứa glucose và prebiotic. Tuy nhiên, khi không có nguồn carbon trong môi trường thì tăng trưởng của lợi khuẩn thấp rõ rệt sau 24 giờ (Hình 9.2).

9.2.3. Kích thích tăng trưởng vi khuẩn gây bệnh bởi prebiotic và chỉ số prebiotic

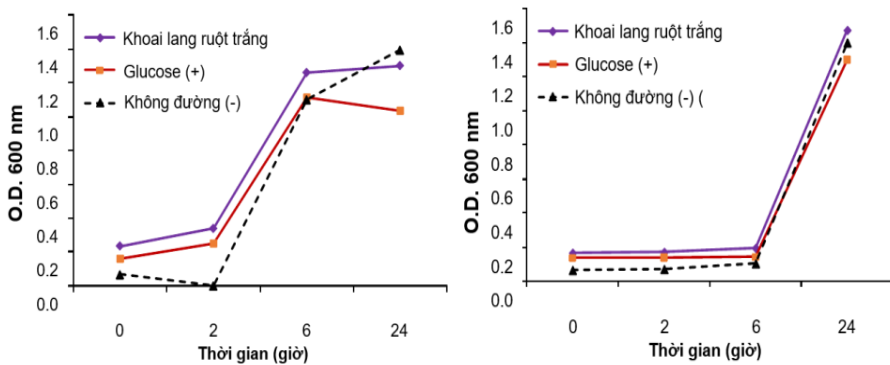
Kết quả cho thấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có khả năng sử dụng prebiotic ly trích từ khoai lang trắng tốt hơn với chủng vi khuẩn *Vibrio harveyi* (Hình 9.3). So với nghiệm thức đối chứng thì tăng trưởng của *Vibrio harveyi* khác biệt không đáng kể. Do đó, *Vibrio harveyi* không bị ảnh hưởng bởi nguồn carbon như đường glucose và prebiotic.

Bên cạnh đó, chỉ số prebiotic của vi khuẩn *V. haveryi* và *V. parahaemolyticus* lần lượt là 0,6 và 0,25. Điều này cho thấy prebiotic ly trích từ khoai lang ruột trắng hỗ trợ vi khuẩn *V. haveryi* tốt hơn vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.



Hình 9.2. Sự tăng trưởng của LAB TV32 trong môi trường m-MRS với các prebiotic khác nhau

Nghiệm thức không đường được sử dụng như đối chứng âm; nghiệm thức glucose được sử dụng như nghiệm thức đối chứng dương.

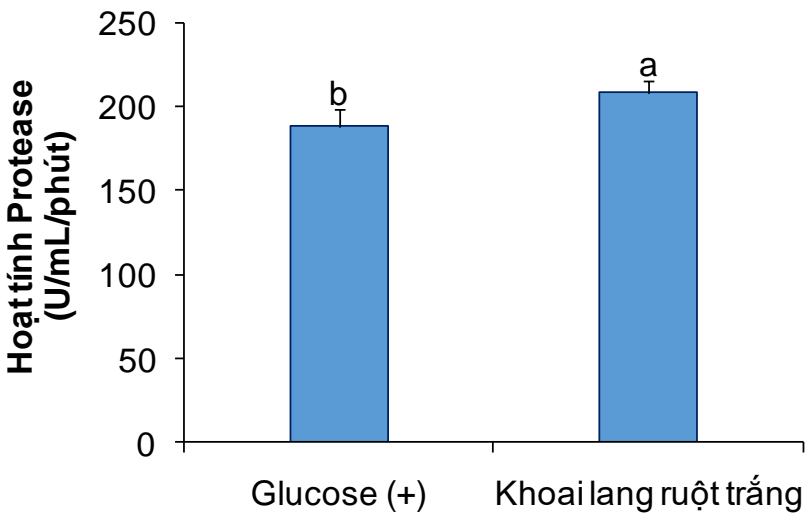


Hình 9.3. Sự tăng trưởng của *V. haveryi* (trái) và *V. parahaemolyticus* (phải) trong môi trường m-MRS chứa prebiotic

Nghiệm thức không đường được sử dụng như đối chứng âm; nghiệm thức glucose được sử dụng như nghiệm thức đối chứng dương.

9.2.4. Hoạt tính protease của lợi khuẩn nuôi trong môi trường chứa prebiotic

Với nguồn carbon là prebiotic trong môi trường nuôi cấy *m*-MRS thì lợi khuẩn LAB TV32 sinh hoạt tính protease cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với đường glucose ($p < 0,05$).



Hình 9.4. Hoạt tính protease sinh ra bởi lợi khuẩn LAB TV32 trong môi trường chứa glucose và prebiotic

9.3. KẾT LUẬN

Quy trình giúp tìm được sản phẩm prebiotic có nguồn gốc tự nhiên có khả năng gia tăng hoạt tính enzyme protease và tăng trưởng của lợi khuẩn *Lactobacillus* TV32, tạo cơ sở cho việc phát triển sản phẩm synbiotic sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, trong quá trình ứng dụng cũng lưu ý đối với những sản phẩm tự nhiên khác nhau, thời gian ly trích, dung môi ly trích thì kết quả sàng lọc có thể thay đổi. Do đó, cần tiếp tục nghiên cứu thêm một số loài khác để có thể điều chỉnh phù hợp trong điều kiện áp dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbas, M. I., & Talib, A. H. (2018). Community Structure of Zooplankton and Water Quality Assessment of Tigris River within Baghdad/Iraq. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 6(2), 63-69.
- Ajitha, S., Sridhar, M., Sridhar, N., Singh, I. S. B., & Varghese, V. (2004). Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus (Fenneropenaeus) indicus* (H. Milne Edwards). *Asian Fish Science*, 17, 71-80.
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., & Arasu, M. V. (2020). Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1), 474-479.
- Alem, M. I., & Alexander, M. (1960). Nutrition and physiology of *Nitrobacter agilis*. *Applied microbiology*, 8(2), 80-84.
- APHA (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater, 23th edition*. American Public Health Association 800 I Street, NW, Washington, DC.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.
- Barrow, G. H., & Feltham, R. K. A. (1993). Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. 3rd Edition. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase, α and β . In S. P. Colowick & N. O. Kaplan (eds), *Methods in Enzymology* (pp. 149-158). New York, NY, USA.
- Berzins, B., & Pejler, B. (1987). Rotifer occurrence in relation to pH. *Hydrobiologia*, 182, 171-182.
- Boltovskoy, D. (1999). *South Atlantic Zooplankton, Volume 1.2*. Backhuys Publishers, Leiden.
- Boonmee, R., & Rengpipat, S. (2015). Effects of Musa (ABB group) prebiotic and *Bacillus subtilis* S11 probiotic on growth and disease resistance of cultivated Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Maejo International Journal of Science and Technology*, 9(3), 370-381.

- Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J. G., & Sermswan, R. W. (2017). Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express*, 7(1), 16.
- Bouchard, R. W. (2012). Guide to Aquatic Invertebrate Families of Mongolia. Identification Manual for Students, Citizens Monitors, and Aquatic Resource Professionals. 218 pp.
- Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (1992). *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn University, Alabama 36849.
- Brenner, D. J., Staley, J. T., & Krieg, N. R. (2005). Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, & G. M. Garrity (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 27-32). Springer.
- Chankaew, S., Thong, S. O., & Sangnoi, Y. (2017). Nitrogen removal efficiency of salt tolerant heterotrophic nitrifying bacteria. *Chiang Mai Journal of Science*, 44, 1-10.
- Cheikhyyoussef, A., Pogori, N., Chen, H., Zhao, J., Tang, J., Chen, W., & Zhang, H. (2009). Comparison of three different methods for the isolation of bacteriocin-like inhibitory substances from *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. *Journal of rapid methods & automation in microbiology*, 17, 182-194.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic *Vibrios* by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208, 1-10.
- Đặng Ngọc Thanh, Thái Trần Bái, & Phạm Văn Miên (1980). *Định loại động vật không xương sống Bắc Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Deibel, D. (1994). Marine biodiversity monitoring: Monitoring protocol for zooplankton. Ocean Science Center, Canada.
- Ehrlich, G. G. (1975). Water quality: Analytical Methods - Nitrifying bacteria (most probable number, MPN, method). In R. J. Pickering (Ed.), *Quality of water branch technical memorandum*. No. 75.13 p.
- Environment Agency Assessing Water Quality (1997). General Quality Assessment (GQA) scheme for Biology. Environment Agency, Bristol, UK.

Fatokun, N. E., Nwodo, U. U., & Okoh, I. A. (2016). Classical Optimization of Cellulase and Xylanase Production by a Marine Streptomyces Species. *Applied Sciences*, 6(10), 286.

Fritsch, C., Vogel, R. F., & Toelstede, S. (2015). Fermentation performance of lactic acid bacteria in different lupin substrates-influence and degradation ability of antinutritives and secondary plant metabolites. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 1075-1088.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268.

Hall, B. D., Bodaly, R. A., Fudge, R. J. P., Rudd, J. W. M., & Rosenberg, D. M. (1997). Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish. *Water Air and Soil Pollution*, 100, 13–24.

Hirano, T., Kurosawa, H., Nakamura, K., & Amano, Y. (1996). Simultaneous removal of hydrogen sulphide and trimethylamine by bacterial deodorant. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 337-342.

Hucker, G. J., & Conn, H. J. (1923). *Methods of Gram Staining*. New York Agricultural Experiment Station.

Huỳnh Trường Giang, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên, Vũ Hùng Hải, Phạm Thị Tuyết Ngân, & Vũ Ngọc Út (2020). Đánh giá hoạt tính của vi khuẩn *Lactobacillus* từ ruột tôm thẻ chân trắng có tiềm năng probiotic để bổ sung vào thức ăn tôm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(1), 102-111.

Huynh, T. G., Chi, C. C., Nguyen, T. P., Tran, T. T. H., Cheng, A. A., & Liu, C. H. (2018). Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 46, 2416-2428.

Huynh, T. G., Chi, C. C., Nguyen, T. P., Tran, T. T. H., Cheng, A. A., & Liu, C. H. (2018). Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 46, 2416-2428.

Kafilzadeh, F., & Dehdari, F. (2015). Amylase activity of aquatic Actinomycetes isolated from the sediments of mangrove forests in south of Iran. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(2), 197-201.

Kandler, O., & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212 AL. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp. 1209-1234). Baltimore: Williams and Wilkins.

Kewcharoen, W., & Srisapoome, P. (2019). Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 175 - 189.

Lewis, R. F., & Pramer, D. (1958). Isolation of *Nitrosomonas* in pure culture. *Journal of bacteriology*, 76(5), 524–528.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

MacDonald, R. M., & Spokes, J. R. (1980). A selective diagnostic medium for ammonia oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 8, 143-145.

Marlida, R., Suprayudi, M. A., Widanarni, & Harris, E. (2014). Growth, digestive enzyme activity and health status of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) fed with synbiotic. *Pakistan Journal of Nutrition*, 13(6), 319-326.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 3, 426-428.

Montràs, A., Pycke, B., Boon, N., Gòdia, F., Mergeay, M., Hendrickx, L., & Pérez, J. (2008). Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in an autotrophic nitrifying biofilm reactor as depicted by molecular analyses and mathematical modelling. *Water Research*, 42(6-7), 1700-1714.

Nadella, R. K., Vaiyapuri, M., Kusunur, A. B., Joseph, T. C., & Velayudhan, L. K. (2019). Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria (*Halothiobacillus* sp.) from aquaculture farm soil. *Journal of Environmental Biology*, 40(3), 363-369.

Nguyễn Thị Kim Liên, Huỳnh Trường Giang, & Vũ Ngọc Út (2014). Thành phần động vật đáy (Zoobenthos) trên sông Hậu. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 2014(2), 239-247.

Nguyễn Văn Khôi (2011). Phân lớp chân mái chèo Copepoda, biển, Động vật chí Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 385 trang.

Nguyễn Xuân Quỳnh, Pinder, C., & Tilling, S. (2001). Định loại các nhóm động vật không xương sống nước ngọt ở Việt Nam. NXB Đại học quốc gia Hà Nội.

Onilude, A. A., Ayinla, G. S., & Eluehike, C. (2017). Properties of alpha-amylase of *Lactobacillus plantarum* isolated from cassava waste samples. *Biotechnology Journal International*, 19, 1-14.

Phan, D. D., Nguyen, V. K., Le, T. N. N., Dang, N. T. H., & Hai, T. (2015). Identification Handbook of Freshwater Zooplankton of the Mekong River and its Tributaries. Mekong River Commission, Vientiane.

Ravichandra, P., Mugeraya, G., Rao, A., Ramakrishna, M., & Jetty, A. (2007). Isolation of *Thiobacillus* sp. from aerobic sludge of distillery and dairy effluent treatment plants and its sulfide oxidation activity at different concentrations. *Journal of environmental biology*, 28(4), 19-23.

Ren, L., Zhang, Z., Zeng, X., Ma, Y., Zeng, Y., & Zhou, C. (2011). Community Structure of Zooplankton and Water Quality Assessment of Jialing River in Nan Chong. *Procedia Environmental Sciences*, 10(B), 1321-1326.

Sangpradub, N., & Boonsoong, B. (2006). Identification of freshwater invertebrates of the Mekong River and its tributaries. Mekong River Commission, Vientiane.

Shirota, A. (1966). The Plankton of South Vietnam, Freshwater and Marine plankton. Oversea. Technical cooperation agency, Japan.

Somsiri, T., Chinabu, S., Phuong, N. T., & Oanh, D. T. H. (2006). A simple device for sampling pond sediment. *Aquaculture*, 258, 650-654.

Spieck, E. & Bock, E. (2005). The Proteobacteria, Part Introductory Essays. In G. Garrity (Ed.), *The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (149-153). New York, USA, Springer.

Staub, R., Appling, J. W., Hofstetter, A. M., & Haas, I. J. (1970). The effects of Industrial wastes of Memphis and Shelby county on primary planktonic producers. *BioScience*, 20, 905-912.

Takizawa, M., Hill, R. T., & Colwell, R. R. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 997-1002.

Tsen, E. H., Lin, Y. P., Huang, H. W., & King, A. E. (2007). Accelerated storage testing of freeze-dried immobilized *Lactobacillus acidophilus*-fermented banana media. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31, 688-701.

Ullah, I., Nadeem, R., Iqbal, M., & Manzoor, Q. (2013). Biosorption of chromium onto native and immobilized sugarcane bagasse waste biomass. *Ecological Engineering*, 60, 99-107.

Williams, S. T., & Cross, T. (1971). Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. *Methods in Microbiology*, 4, 295-334.

Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W., & Zhou, L. X. (2011). Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 102, 854-862.

Yun, L., Yu, Z., Li, Y., Luo, P., Jiang, X., Tian, Y., & Ding, X. (2019). Ammonia nitrogen and nitrite removal by a heterotrophic *Sphingomonas* sp. strain LPN080 and its potential application in aquaculture. *Aquaculture*, 500, 477-484.

Yunfang, H. M. S. (1995). *Atlas of freshwater biota in China*. China Ocean Press.

Zheng, B. H., Tian, Z. Q., Zhang, L., & Zheng, F. D. (2007). The characteristics of the hydrobios' distribution and the analysis of water quality along the west shore of Taihu Lake. *Acta Ecologica Sinica*, 27, 4214-4223.



QUI TRÌNH KỸ THUẬT
QUAN TRẮC VÀ PHÁT TRIỂN
CÁC DÒNG VI KHUẨN CÓ LỢI CHO
QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG NƯỚC
TRONG NUÔI THỦY SẢN

221350H00
ISBN: 978-604-67-2165-9



9 786046 721659

Xuất bản phẩm không bán