

# BIẾN ĐỘNG MẬT ĐỘ VI KHUẨN HỮU ÍCH TRONG AO NUÔI TÔM SÚ (*PENAEUS MONODON*) THÂM CANH

Phạm Thị Tuyết Ngân<sup>1</sup> và Nguyễn Hữu Hiệp<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Total bacteria, Vibrio and density of some beneficial bacteria in intensive shrimp culture ponds were determined. Sampling and sample processing were followed by the methods described by Huy (2003) and Chinabut et al. (2003). The density of Nitrosomonas and Nitrobacter were determined by MPN (most probable number) method. The results showed that the density of the total bacteria in pond sediment fluctuated from  $5.3 \times 10^4$  CFU/g to  $1.2 \times 10^6$  CFU/g. The total bacteria count in the pond water was always lower when compared to that of sediment which fluctuated from  $2.9 \times 10^2$  to  $3 \times 10^4$  CFU/mL. Bacillus density did not change during sampling and slightly fluctuated from  $4.3 \times 10^4$  to  $7.9 \times 10^5$  CFU/g, covering 87.9% of total bacteria count. On the other hand, the density of group Nitrosomonas fluctuated from 7 to  $2.6 \times 10^3$  cells/g and shared 40.7% of total bacteria count. Nitrobacter group could only be found at the fourth sampling, had the lowest total count when compared to other groups, fluctuated from 5.5 to  $1.9 \times 10^3$  cells/g, and shared 28.3% of total bacteria count. However, Vibrio tended to increase during the entire production cycle.*

**Keywords:** total bacteria, Vibrio, Bacillus, Nitrosomonas, Nitrobacter, intensive shrimp culture

**Title:** The variation of beneficial bacteria density in the intensive cultivated shrimp ponds

## TÓM TẮT

*Tổng vi khuẩn, Vibrio và một số nhóm vi khuẩn hữu ích đã được xác định trong ao nuôi tôm thâm canh tại tỉnh Sóc Trăng. Phương pháp thu mẫu được áp dụng theo (Huy 2003 và Chinabut et al., 2003). Mật số Nitrosomonas và Nitrobacter được tính theo phương pháp MPN (Most Probable Number, số khả hữu). Kết quả cho thấy mật độ tổng vi khuẩn trong bùn dao động từ  $5,3 \times 10^4$  CFU/g đến  $1,2 \times 10^6$  CFU/g nhưng mật độ trong nước ít hơn rất nhiều, từ  $2,9 \times 10^2$  đến  $3 \times 10^4$  CFU/mL. Nhóm Bacillus có khuynh hướng ổn định trong suốt quá trình thu mẫu và dao động từ  $4,3 \times 10^4$  đến  $7,9 \times 10^5$  CFU/g, chiếm trung bình 87,9% so với tổng vi khuẩn. Trong khi đó mật độ nhóm Nitrosomonas dao động từ 7 tế bào/g đến  $2,6 \times 10^3$  tế bào/g và chiếm trung bình 40,7% so với tổng vi khuẩn. Nitrobacter chỉ thấy từ đợt thu mẫu thứ 4 và có mật độ thấp nhất từ 5,5 đến  $1,9 \times 10^3$  tế bào/g bùn, chiếm 28,3% so với tổng vi khuẩn. Ngoài ra, mật độ Vibrio có khuynh hướng tăng dần trong suốt thời gian nuôi.*

**Từ khóa:** tổng vi khuẩn, Vibrio, Bacillus, Nitrosomonas, Nitrobacter, tôm sú thâm canh

## 1 GIỚI THIỆU

Quản lý môi trường ao nuôi tôm thâm canh bằng các biện pháp sinh học ngày càng được áp dụng rộng rãi. Giải pháp này vừa có ý nghĩa quản lý hữu hiệu môi trường

<sup>1</sup> Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ

trong ao nuôi đồng thời hạn chế thải nước bẩn ra môi trường có thể gây tác động xấu đến môi trường. Các nhà khoa học đang tập trung nghiên cứu những lợi ích của các vi sinh vật hữu ích thông qua cơ chế tác động của chúng như sản xuất các hợp chất ức chế vi sinh vật gây hại, cạnh tranh về dinh dưỡng và nơi cư trú, tiết enzyme phân hủy hợp chất hữu cơ giúp cải thiện môi trường ao nuôi, hỗ trợ quá trình tiêu hóa cho đối tượng nuôi... Một trong các nhóm vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất là *Bacillus*. *Bacillus* được biết là vi khuẩn tiết ra enzyme phân hủy các chất bột đường, chất béo và chất đạm thành những đơn vị nhỏ hơn. Giống *Bacillus* có thể sinh trưởng tốt với nguồn carbon và nitơ nghèo (Sonnenschein *et al.*, 1998). Giống *Bacillus* cũng có khả năng phân hủy các chất hữu cơ tích lũy trong nền đáy ao nuôi tôm (Lin, 1995; Ringpipat *et al.*, 1998; Verschuere *et al.*, 2000); trích dẫn bởi (Leonel, 2005). Theo (Moriarty 1996 và 1998), *Bacillus* tiết ra nhiều enzyme ngoại bào, những vi khuẩn này đã được sử dụng rộng rãi như vi sinh vật hữu ích. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng khi bổ sung vi khuẩn này vào môi trường nuôi tôm sú thì tỉ lệ sống của tôm được cải thiện đáng kể và hệ miễn dịch tăng lên rõ rệt (Rengripat *et al.*, 1998, 2000). Vaseeharan 2003 chứng minh được hiệu quả ức chế sự phát triển của vi khuẩn phát sáng *Vibrio harveyi* của *Bacillus subtilis* trong môi trường nuôi tôm sú, làm giảm tỉ lệ hao hụt được 90%.

Ngoài ra, còn nhóm vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa đạm trong chu trình nitơ là nhóm vi khuẩn nitrate hóa, chúng có khả năng chuyển  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$  thành  $\text{NO}_3^-$ .  $\text{NH}_3$  làm giảm oxy trong ao nuôi, cần có 4,7g oxy để oxy hóa 1 g  $\text{NH}_3$ . Trong khí đó  $\text{NO}_2^-$  rất độc đối với đời sống thủy sinh vật và có thể gây ra chứng giảm khả năng vận chuyển oxy trong máu của chúng (Tăng Thị Chính *et al.*, 2003). Các vấn đề này được giải quyết nhờ vào nhóm vi khuẩn *Nitrosomonas* có khả năng oxy hóa  $\text{NH}_3$  thành  $\text{NO}_2^-$  rồi sau đó  $\text{NO}_2^-$  tiếp tục được oxy hóa thành  $\text{NO}_3^-$  (có lợi cho môi trường và thủy sinh vật) nhờ nhóm vi khuẩn *Nitrobacter*.

Hiện nay, ở Việt Nam người nuôi thủy sản sử dụng chế phẩm sinh học rất phổ biến để cải thiện chất lượng nước. Tuy vậy, chưa có nghiên cứu nào công bố về các chủng vi sinh vật hữu ích khi đưa vào môi trường nước tồn tại và phát triển như thế nào. Hiện nay rất ít nghiên cứu về sự có mặt và sự biến động cũng như thành phần và số lượng của vi khuẩn nitrate trong ao nuôi tôm sú thâm canh. Để đánh giá một cách đầy đủ và chính xác vai trò của chúng nhằm chủ động điều khiển chúng giúp quản lý tốt hơn môi trường nuôi, một nghiên cứu đã được thực hiện tại khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Vì vậy, đề tài này được thực hiện nhằm mục đích xác định sự biến động các nhóm vi khuẩn nói trên trong ao nuôi tôm sú thâm canh từ đó đánh giá khả năng cải thiện chất lượng nước thông qua các thông số môi trường.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Địa điểm thu mẫu

Chọn một hộ nuôi tôm đã thành công trong nhiều năm liền và từ đó chọn 4 ao nuôi có chế độ chăm sóc giống nhau. Hộ nuôi thuộc ấp Tân Tĩnh, xã Vĩnh Hiệp, huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Mật độ tôm thả nuôi 30 tôm bột/m<sup>2</sup> và diện tích ao 1

ha, độ sâu ao 1m. Chế phẩm vi sinh Pro-W (Sanolife<sup>®</sup>, INVE) đã được sử dụng bón vào ao trước khi thả tôm và sau đó định kỳ 7 ngày/lần trong suốt quá trình nuôi. Liều lượng sử dụng 200g/ha/lần sử dụng. *Bacillus subtilis* là thành phần chính của chế phẩm vi sinh này. Thời gian thu mẫu bắt đầu từ tháng 1/2008 đến tháng 6/2008. Nhịp thu mẫu trước khi thả tôm, sau khi thả tôm và sau đó 2 tuần/lần cho đến khi kết thúc vụ nuôi (5 tháng).

## 2.2 Phương pháp thu mẫu

Trước khi thu mẫu, các ống falcon dùng chứa mẫu đã được tiệt trùng (20 phút ở nhiệt độ 121°C). Khi thu mẫu ghi nhận đầy đủ các chỉ tiêu môi trường như pH, nhiệt độ, độ mặn, hàm lượng oxy hòa tan, màu nước, các biến đổi về thời tiết tại điểm thu mẫu và đồng thời ghi nhận vị trí thu mẫu. Mẫu bùn được thu bằng hệ thống ống PVC đã được tiệt trùng bằng dung dịch cồn 70% (Chinabut *et al.*, 2003). Tại mỗi ao, mẫu bùn được thu ở 3 vị trí gồm đầu ao, giữa ao và cuối ao theo một đường chéo. Ở mỗi vị trí thu khoảng 100 g bùn. Mẫu được giữ lạnh tại chỗ bằng nước đá và chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 3-5 giờ và được bảo quản ở 4°C và xử lý trong vòng 2 giờ. Tại phòng thí nghiệm 3 mẫu bùn được trộn lẫn vào nhau thành một mẫu đại diện cho ao đó.

## 2.3 Phương pháp xác định mật độ

Mật độ vi khuẩn được xác định theo phương pháp của (Huys, 2002).

### 2.3.1 Xác định mật độ tổng vi khuẩn và *Vibrio*

Chuẩn bị các ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý (0,85%) đã tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút để pha loãng mẫu. Chuẩn bị môi trường TSA (Trypticase Soya Agar) + 1,5% muối (TSA<sup>+</sup>) và TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar) để cấy vi khuẩn.

Tại phòng thí nghiệm lấy mẫu bùn ra khỏi tủ mát và để nhiệt độ phòng. Mở nắp dụng cụ chứa mẫu trong tủ cấy tiệt trùng rồi chuyển 1 g mẫu bùn từ mỗi vị trí thu mẫu của cùng 1 ao sang các ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý đã tiệt trùng, trộn đều bằng máy trộn Vortex khoảng 1 phút. Sau đó lấy từ mỗi mẫu này 3 mL dạng dung dịch huyền phù vi khuẩn tại phần giữa của ống nghiệm chuyển sang một ống nghiệm rộng đã tiệt trùng rồi trộn với nhau thành 1 mẫu 9 mL đại diện cho ao đó, được độ pha loãng 10<sup>-1</sup>. Tiếp tục pha loãng mẫu đến khoảng 10<sup>-6</sup> tùy thuộc vào mật độ vi khuẩn trong bùn đáy ao theo cách sau: lắc đều mẫu 10<sup>-1</sup> trong 1 phút rồi để yên cho lắng 30 giây và chuyển 1 mL dung dịch ở phần giữa ống nghiệm sang ống nghiệm khác chứa 9 mL nước muối sinh lý được độ pha loãng 10<sup>-2</sup>. Tiếp tục pha loãng theo cách này đến khi đạt được độ pha loãng thích hợp, bắt đầu từ độ pha loãng 10<sup>-2</sup> chỉ lắc 30 giây và để lắng 15 giây.

Sau đó chọn 3 độ pha loãng thích hợp cho mật độ của vi khuẩn tổng cộng và vi khuẩn *Vibrio* hiện diện trong các ao, rồi hút 100 µl từ mỗi nồng độ pha loãng của mẫu bùn trong mỗi ao cho vào các đĩa môi trường TSA (thêm 1,5% NaCl) và TCBS, dùng que thủy tinh trải đều. Mỗi nồng độ pha loãng lặp lại 3 lần. Ủ các đĩa môi trường ở 30°C trong 24–28 giờ. Sau khi ủ kiểm tra môi trường nuôi cấy để xác định số khuẩn lạc dao động trong khoảng từ 20 đến 200 khuẩn lạc và được tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc/g bùn. Xác định số lượng khuẩn lạc trong mỗi

đĩa môi trường và tính số lượng trung bình cùng độ lệch chuẩn. Số lượng vi khuẩn được tính bằng công thức:

$$\text{Mật số vi khuẩn (CFU/g bùn)} = \text{số khuẩn lạc} \times \text{độ pha loãng} \times 10$$

### 2.3.2 Xác định mật độ vi khuẩn *Bacillus*, *Nitrosomonas* và *Nitrobacter*

#### a) Xác định mật độ vi khuẩn *Bacillus*:

Áp dụng phương pháp pha loãng mẫu bùn giống như đã trình bày ở phần 2.3.1. Sau khi pha loãng đặt nhiệt kế vào một ống nghiệm khác có chứa nước (không cần tiệt trùng) rồi xếp tất cả các ống nghiệm vừa pha loãng và ống nghiệm có nhiệt kế vào cùng một giá, để vào nước nóng ở 80°C. Khi nhiệt kế đạt 80°C trong 10 phút thì lấy các ống nghiệm ra (Nguyễn Lâm Dũng, 1983, Harwood và Archibald, 1990). Dùng micropipete hút 100 µL dung dịch huyền phù vi khuẩn cho vào các đĩa chứa môi trường chuyên biệt cho giống *Bacillus* và dùng que thủy tinh tán đều đến khi mẫu khô. Mỗi mẫu bùn cần chọn 3 độ pha loãng khác nhau, mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Ủ mẫu ở 28°C trong 24-48 giờ rồi xác định mật số như cách đã trình bày ở phần 2.3.1.

#### b) *Nitrosomonas* và *Nitrobacter*:

Xác định mật số vi khuẩn bằng phương pháp số khả hữu (MPN) (Pickering, 1975).

*Chuẩn bị môi trường ammonium-calcium-carbonate cho MPN của nhóm vi khuẩn oxi hóa ammonium (Nitrosomonas):* (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5g); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1g); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,03g); NaCl (0,3g); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,3g); CaCO<sub>3</sub> (7,5g); 1000 mL nước cất. Lấy 5mL môi trường này cho vào ống nghiệm để nuôi vi khuẩn, đem tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút.

*Chuẩn bị môi trường nitrite-calcium-carbonate cho MPN nhóm vi khuẩn oxi hóa nitrite (Nitrobacter)* KNO<sub>2</sub> (0,006g); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1g); NaCl (0,3g); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1g); CaCO<sub>3</sub> (1g); CaCl<sub>2</sub> (0,3g) 1000 mL nước cất. Lấy 5 mL môi trường này cho vào các ống nghiệm để nuôi vi khuẩn, tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút.

#### *Thuốc thử Griess – Ilosway*

*Dung dịch A:* hòa tan 0,6 g sunfanilic acid trong 10 mL nước cất nóng (90°C), để nguội cho thêm 20 mL HCl đậm đặc. Pha loãng hỗn hợp này thành 100 mL với nước cất rồi trộn đều. *Dung dịch B:* hòa tan 0,6 g, α-naphthylamine trong 10-20 mL HCl đậm đặc, pha loãng thành 100 mL với nước cất và trộn đều. *Dung dịch C:* Hòa tan 16,4 g sodium acetate trong nước cất, pha loãng thành 100 mL với nước cất sau đó trộn đều. Bảo quản riêng biệt từng dung dịch này trong 3 chai tối, giữ trong tủ lạnh, thời gian sử dụng không quá 1 tháng. Hỗn hợp kẽm-đồng-manganese dioxide: trộn đều 1 g bột kim loại Zn, 1g MnO<sub>2</sub> và 1g bột kim loại Cu.

#### Pha loãng mẫu bùn

Các mẫu trắng (blank) dùng để pha loãng mẫu bùn: chuẩn bị các chai 250 mL chứa 90 mL nước cất và tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút. Trộn lẫn 3 mẫu bùn ở 3 vị trí của ao rồi chuyển 10 g bùn vào chai chứa 90mL nước cất tiệt trùng, lắc đều bằng tay 25 lần. Ngay sau khi lắc chuyển 10 mL từ phần trung tâm của dung dịch huyền

phù này sang chai chứa 90 mL nước cất tiệt trùng khác, lắc đều 25 lần. Tiếp tục đến khi đạt được độ pha loãng thích hợp cho mật độ vi khuẩn trong mẫu.

Mỗi ao chuẩn bị 9 ống nghiệm chứa môi trường amonium-calcium-carbonate và 9 ống nghiệm chứa môi trường nitrite-calcium-carbonate, chuyển 1 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn ở 3 độ pha loãng thích hợp cho vào các ống nghiệm chứa môi trường trên, mỗi độ pha loãng lập lại 3 lần. Mỗi môi trường lấy 3 ống nghiệm, các ống nghiệm này chỉ chứa môi trường nuôi không cho dung dịch vi khuẩn vào để làm đối chứng âm. Các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn và các ống đối chứng âm này được ủ ở 28°C khoảng 21 ngày.

Sau khi ủ, kiểm tra sự có mặt của  $\text{NO}_2^-$  ở các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn và các ống đối chứng âm bằng thuốc thử Griess-Ilosway. Trộn lẫn các phần đều nhau của thuốc thử dung dịch A, B và C, sau đó thêm vài giọt dung dịch huyền phù vi khuẩn từ mỗi ống. Quan sát sự phát triển của màu đỏ hồng trong 5 phút.

**Xác định dương tính đối với nhóm AOB** (ammonia oxidizing bacteria) vi khuẩn oxy hóa amonia: tất cả các ống chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn của môi trường amonium-calcium-carbonate xuất hiện màu đỏ hồng trong 5 phút khi có mặt  $\text{NO}_2^-$ . Phản ứng màu chứng tỏ có sự hiện diện của nhóm AOB. Trong trường hợp các ống nghiệm này không xuất hiện màu đỏ hồng trong 5 phút thì cho 1 lượng nhỏ hỗn hợp Zn-Cu-MnO<sub>2</sub>, nếu có màu đỏ xuất hiện cho thấy sự có mặt của nhóm AOB. Bởi vì kết quả âm tính đối với  $\text{NO}_2^-$  ở phản ứng đầu cho thấy  $\text{NO}_2^-$  được hình thành bởi nhóm AOB đã bị oxi hóa thành  $\text{NO}_3^-$  bởi nhóm NOB.

**Xác định dương tính đối với nhóm NOB:** tất cả các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn của môi trường nitrite-calcium-carbonate không xuất hiện màu đỏ hồng sau khi phản ứng với thuốc thử Griess-Ilosway chứng tỏ không còn  $\text{NO}_2^-$  nữa do đã được chuyển toàn bộ thành  $\text{NO}_3^-$  bởi nhóm NOB.

Nếu các ống đối chứng âm cho kết quả dương tính sau khi nhỏ thuốc thử chứng tỏ môi trường đã bị nhiễm.

Xác định số lượng ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn cho phản ứng dương tính: kiểm tra 3 độ pha loãng, kết quả từ 3 lần lập lại của mỗi độ pha loãng được sử dụng để xác định chỉ số MPN. Cách chọn 3 độ pha loãng để xác định chỉ số MPN là độ pha loãng đầu tiên là độ pha loãng cao nhất mà cả 3 lần lập lại đều cho kết quả dương tính sau khi nhỏ thuốc thử, 2 độ pha loãng tiếp sau đó cao hơn. Sau khi kiểm tra ghi nhận các kết quả dương tính và âm tính từ các ống nghiệm. Tra cứu bảng 1-MPN tiêu chuẩn để xác định số lượng có thể có của nhóm AOB và NOB trong 1 gam mẫu bùn.

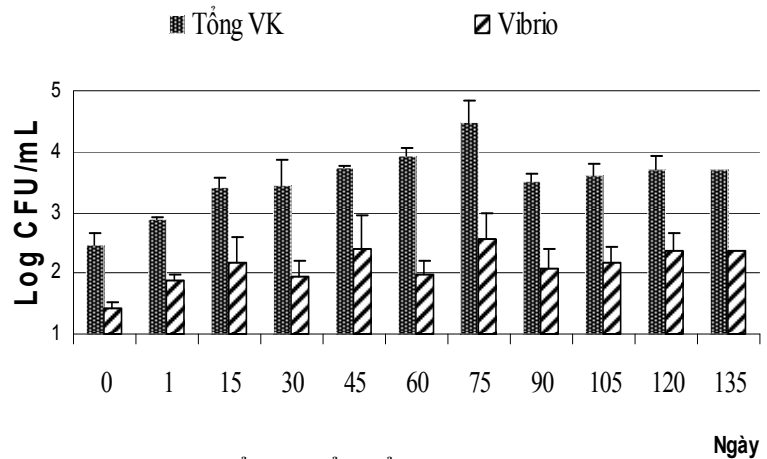
### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Sự biến động mật độ vi khuẩn tổng và *Vibrio* trong nước và trong bùn

##### 3.1.1 Biến động mật độ vi khuẩn tổng và *Vibrio* trong nước

Kết quả khảo sát cho thấy mật độ vi khuẩn tổng trong nước tăng dần theo thời gian nuôi từ  $2,46 \times 10^3$  đến  $3 \times 10^4$  CFU/mL (Hình 1). Mật độ và sự dao động của vi

khuẩn tổng trong nước nhìn chung vẫn còn ở mức thấp và biến động nhỏ. Thông thường sự tích lũy vật chất hữu cơ trong quá trình nuôi thâm canh là nguyên nhân làm tăng mật số vi khuẩn dị dưỡng trong ao. Tuy nhiên, việc xử lý vi sinh định kỳ 7 ngày/lần đã góp phần đáng kể vào sự gia tăng và ổn định mật độ vi khuẩn trong ao. Theo (Anderson 1993), trong môi trường nước sạch mật độ vi khuẩn tổng nhỏ hơn  $10^3$



Hình 1: Tổng vi khuẩn và tổng Vibrio trong nước

CFU/mL, nếu mật độ vi khuẩn vượt quá  $10^7$  CFU/mL sẽ có hại cho tôm cá nuôi và môi trường trở nên bẩn. Như vậy kết quả về mật độ vi khuẩn khảo sát được vẫn còn nằm trong giới hạn cho phép, chứng tỏ môi trường nước ao sạch và không nhiễm bẩn.

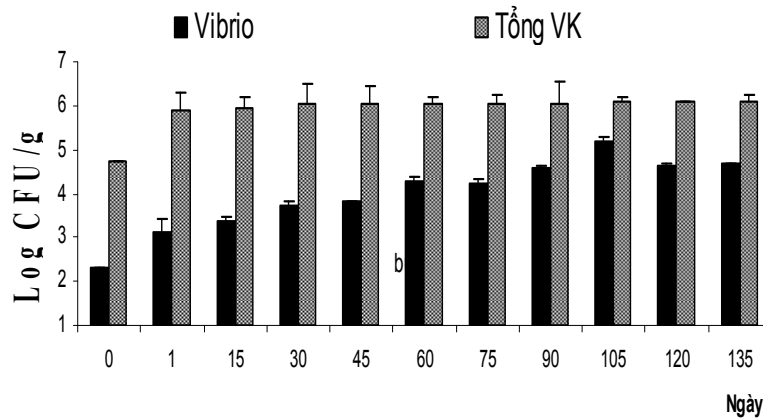
Tương tự như sự biến động mật độ vi khuẩn tổng, *Vibrio* trung bình ở các ao khảo sát có khuynh hướng tăng dần từ 26 CFU/mL đến  $3,4 \times 10^2$  CFU/mL (Hình 3.1) trong 15 ngày đầu, nhưng sau đó biến động tăng giảm không ổn định, tuy nhiên mật độ cao nhất chỉ thấp hơn  $10^3$  CFU/mL. Theo Moriaty (1999) mật độ an toàn *Vibrio* có hại, đặc biệt là vi khuẩn phát sáng vượt quá  $10^3$  thì gây tác hại đến tôm. Lý do mật độ *Vibrio* luôn thấp có thể do vai trò tiết chất kháng sinh của vi khuẩn *Bacillus* có mặt trong chế phẩm vi sinh đã được sử dụng định kỳ. Theo Hasting và Neilson (1981) *Bacillus* có thể tạo ra một số chất kháng khuẩn hoặc một vài sản phẩm có thể tiêu diệt *Vibrio harveyi*. *B. subtilis* cũng đã được tìm thấy có khả năng tiết ra một số hợp chất diệt khuẩn và diệt nấm. Sản phẩm các kháng sinh được tiết ra là difciden và oxydifficidin có khả năng kháng các loài vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí (Zimmerman *et al.*, 1987) và một số kháng sinh thông thường khác như: bacitracin, bacillin và bacillomycin B (Parry *et al.*, 1983).

Mặt khác, mật độ *Vibrio* biến động lớn hơn vi khuẩn tổng. Qua các đợt khảo sát cho thấy mật độ *Vibrio* tăng dần đến lần thu mẫu thứ 5 (ngày nuôi) sau đó giảm nhanh ở lần thu mẫu thứ 6 (ngày nuôi) nguyên nhân có thể trong quá trình nuôi các thuốc diệt tảo và nấm sau đã được sử dụng trong đợt thu mẫu thứ 5 (ngày nuôi) đã làm giảm mật độ *Vibrio*. Tuy nhiên, sau đó mật độ *Vibrio* tiếp tục tăng ở lần thu mẫu thứ 7 (75 ngày nuôi) và giảm lần thu mẫu thứ 8 (90 ngày nuôi) và cuối cùng tăng dần đến đợt thu mẫu thứ 10 (135 ngày nuôi). Tuy nhiên, mức tăng cao nhất không vượt ngưỡng cho phép.

### 3.1.2 Biến động mật độ vi khuẩn tổng và Vibrio trong bùn

Mật độ vi khuẩn tổng trong bùn đáy ao dao động từ  $5,3 \times 10^4$  CFU/g đến  $1,2 \times 10^6$  CFU/g (Hình 2). Biến động giữa các lần thu mẫu là không đáng kể. Mật độ

vi khuẩn tổng có khuynh hướng tăng dần theo thời gian nuôi. So với sự biến động vi khuẩn trong nước thì biến động mật độ vi khuẩn trong bùn nhỏ hơn nhưng mật độ vi khuẩn trong 1g bùn nhiều gần gấp đôi trong 1 mL nước. Nguyên nhân có thể trong bùn hàm lượng chất dinh dưỡng nhiều hơn, là môi trường thích hợp cho vi khuẩn sinh trưởng.



Hình 2: Tổng vi khuẩn và Vibrio trong bùn

Mật độ vi khuẩn *Vibrio* trong bùn đáy ao tăng liên tục ( $2,1 \times 10^2$  đến  $1,5 \times 10^5$  CFU/g) và có khuynh hướng tăng dần

theo chu kỳ nuôi. Trong khi đó mật độ *Vibrio* trong nước dao động từ 26 tế bào đến  $2,3 \times 10^2$  tế bào/mL trong nước và tăng giảm liên tục trong quá trình nuôi. Sự biến động của *Vibrio* cũng tương tự như sự biến động của vi khuẩn tổng trong bùn đáy ao, vi khuẩn *Vibrio* trong bùn ít biến động hơn trong nước và có khuynh hướng tăng dần theo thời gian nuôi.

### 3.2 Biến động mật độ bào tử vi khuẩn *Bacillus*, *Nitrosomonas* (AOB) và *Nitrobacter* (NOB) trong bùn

#### 3.2.1 Biến động mật độ vi khuẩn *Bacillus* trong bùn

Mật độ *Bacillus* trong bùn đáy ao dao động trong khoảng từ  $4,3 \times 10^4$  đến  $7,9 \times 10^5$  CFU/g, chiếm trung bình 87,9% so với tổng vi khuẩn. Trong 3 đợt thu mẫu đầu tiên (15 ngày nuôi) số bào tử dao động từ  $4,3 \times 10^4$  đến  $6,1 \times 10^4$ , nhưng sau đó số lượng bào tử tăng dần và ổn định ở mức cao nhất vào đợt cuối (135 ngày nuôi) là  $7,9 \times 10^5$  CFU/g. Kết quả này cho thấy lượng chế phẩm vi sinh bổ sung vào ao (10 ngày/lần) cùng với lượng thức ăn tích tụ trong ao là điều kiện thuận lợi cho nhóm *Bacillus* phát triển và tồn tại ổn định.

Theo Banwart (2000) thì ở nhiệt độ khoảng 65-85°C trong 10-30 phút sẽ kích thích phần lớn các bào tử và gây cảm ứng nảy mầm, trong điều kiện tương tự thì có thể giết chết các loại vi khuẩn tạp không hình thành bào tử và chỉ còn các bào tử sống sót (Nguyễn Lâm Dũng, 1983). Banwart (2000) cho rằng trong tất cả các loài không phải tất cả các tế bào đều hình thành bào tử dù ở trong bất kỳ điều kiện nào. Tuy nhiên, chưa có thông tin giải thích tại sao một vài tế bào trong môi trường nuôi hình thành bào tử còn một số khác thì không, nhưng có sự chấp nhận là sự hình thành bào tử bắt đầu sau pha tăng trưởng nhanh và trong suốt pha tĩnh.

#### 3.2.2 Sự biến động mật độ vi khuẩn *Nitrosomonas* (AOB) và *Nitrobacter* (NOB)

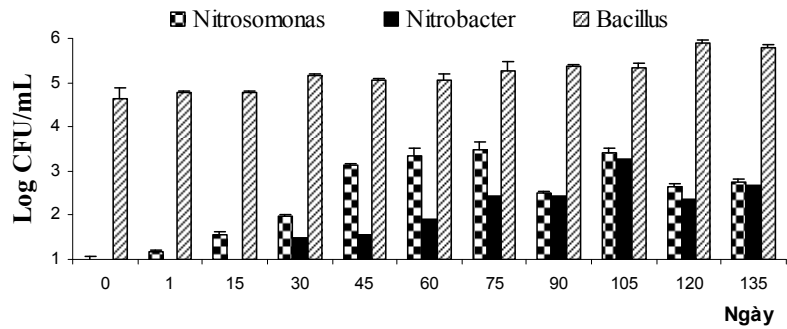
Trong suốt vụ nuôi (gồm 10 đợt thu mẫu định kỳ tại 4 ao nuôi với 40 mẫu)(Hình 3) thì thấy mật độ trung bình của nhóm AOB và NOB trong bùn đáy ao lần lượt chiếm 40,7% và 28,3% so với vi khuẩn tổng cộng.

Nhóm vi khuẩn nitrate hóa thường phân bố ở những nơi có nhiều hợp chất nitơ và muối vô cơ như nước thải công nghiệp, nước cống, đáy ao nhiều bùn vì vậy tại các khu vực đó mật độ của chúng có thể lên đến  $10^4$ - $10^5$  tế bào/g bùn (Rennie và Schmidt, 1977).

AOB phát triển thích hợp ở nồng độ  $\text{NH}_3\text{-N}$  từ 28-140 mg/L còn NOB đòi hỏi nồng độ  $\text{NO}_2\text{-N}$  từ 28-420mg/L (Bock *et al.*, 1986). Trong khi đó  $\text{NH}_3$  ở mức 0,03-0,85 mg/L và  $\text{NO}_2^-$  ở mức 0,06-17 mg/L sẽ gây độc cho động vật thủy sản (Shrama và Ahlert, 1977). Mẫu được thu trong vòng 2,5 tháng tính từ khi thả tôm nên lớp bùn đáy rất ít do ao mới cải tạo bằng cách cày xới, thêm vào đó TAN chỉ ở mức 0,01-2,949mg/L,  $\text{NO}_2^-$  0,009-0,1mg/L. Những điều kiện môi trường này làm cho mật độ vi khuẩn nitrate hóa trong bùn thấp.

Mật độ nhóm AOB qua 10 đợt thu mẫu nằm trong khoảng từ 7 tế bào/g đến  $2,6 \times 10^3$  tế bào/g. Klemedtson *et al.* (1998) định lượng nhóm AOB trong mẫu bùn bằng kỹ thuật MPN, kết quả của tác giả xác định mật độ của chúng khoảng từ  $10^3$ - $10^5$  tế bào/g với pH đất từ 5-6. Herbert (1999) khảo sát thấy nhóm AOB nằm trong khoảng  $10^2$ - $10^4$  tế bào/g. Một nghiên cứu tương tự như vậy của (Hesslsoe *et al.*, 2001) cho thấy mật độ AOB khoảng  $1,79 \times 10^3$  tế bào/g.

So với nhóm AOB thì mật độ của nhóm NOB thấp hơn rất nhiều, chỉ từ  $5,5$ -  $1,9 \times 10^3$  tế bào/g bùn và không có sự hiện diện của chúng trong các đợt 1,2,3 (15 ngày nuôi). Những báo cáo về mật độ nhóm NOB trong đất của một số tác giả như (Degrange và Bardin, 1995) đếm quần thể NOB từ đất bằng phương pháp PCR nằm trong khoảng  $10^1$ ,  $10^2$  hoặc  $10^3$  CFU/g. Rennie và Schmid (1977) cho biết mật độ của chúng cao hơn từ  $10^3$ - $10^4$  CFU/g. NOB trong bùn thấp là do hoạt động và sự phát triển của chúng dễ bị ức chế bởi các yếu tố môi trường như nồng độ  $\text{NH}_3$  và pH cao; oxy hòa tan (DO) và  $\text{NO}_2^-$  thấp, nhiệt độ thấp (Anthniser *et al.*, 1976; Randall và Bath, 1984; Huang *et al.*, 1989; Balmelle *et al.*, 1992; Xang và Allemqn, 1992; Fdz-Blance *et al.*, 1994). Ngoài ra, AOB đặc biệt NOB bị giới hạn mạnh bởi cường độ và thời gian chiếu sáng chủ yếu ánh sáng xanh dương và tím (Olson, 1981). Hoạt động của NOB giảm ngay sau khi tiếp xúc với ánh nắng mặt trời (Vanzella *et al.*, 1985). Trong các ao nuôi thủy sản NOB được xác định miễn cảm với ánh sáng nhiều hơn AOB, điều này góp phần làm mất cân bằng quần thể giữa chúng (Yoshioka và Saijo, 1984). Nhận xét này có thể là một trong số những nguyên nhân giải thích tại sao không có sự hiện diện của nhóm NOB trong đợt thu thứ 1 (trước khi thả tôm) vì độ trong của nước cao do chưa thả tôm còn đợt 2, 3 chỉ mới thả tôm 1 tháng. Thêm vào đó sự không cân bằng giữa AOB và NOB còn do nhu cầu DO của NOB từ 8-10 mg/L, thích hợp  $\geq 10$ mg/L cao hơn rất nhiều so với nhóm AOB (4-6 mg/L)(Balmelle *et al.*, 1992; Grommer, 2003).



Hình 3: Mật độ vi khuẩn suốt thời gian nuôi



Mật độ vi khuẩn tăng lên qua các đợt thu mẫu, đặc biệt trong đợt 5 và 6 (45-60 ngày nuôi), có thể do nồng độ  $\text{NH}_4^+$  và  $\text{NO}_2^-$  ngày càng cao vì quá trình trao đổi chất của tôm tăng lên khi tôm lớn và sự tích lũy thức ăn dư thừa ở đáy ao cũng tăng. Bên cạnh đó, do men vi sinh được bón vào các ao nuôi định kỳ và chỉ sử dụng một loại men đã tạo điều kiện thuận lợi cho quần thể vi sinh vật hữu ích phát triển, cân bằng mật độ vi khuẩn tổng cộng trong ao. Hơn nữa, khi bón vôi định kỳ có tác dụng cải thiện tính chất lý và hóa học của đất, tăng cường hoạt động của vi sinh vật hữu ích nhất là đối với đất chua và mặn (Trần Cẩm Vân, 2000).

#### 4 KẾT LUẬN

- Tổng vi khuẩn trong nước và trong bùn thích hợp cho nuôi tôm sú và dao động từ lần lượt  $2,9 \times 10^2$ - $3 \times 10^4$  CFU/mL và  $5,3 \times 10^4$  CFU/g đến  $1,2 \times 10^6$  CFU/g.
- Số lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus* trong bùn có khuynh hướng ổn định và chiếm ưu thế trong suốt quá trình nuôi và dao động trong khoảng từ  $4,3 \times 10^4$  đến  $7,9 \times 10^5$  CFU/g, chiếm trung bình 87,9% so với tổng vi khuẩn.
- Mật độ nhóm AOB trong bùn dao động từ 7 tế bào/g đến  $2,6 \times 10^3$  tế bào/g và chiếm trung bình khoảng 40,7% so với tổng vi khuẩn.
- Nhóm NOB có mật độ thấp nhất từ 5,5 đến  $1,9 \times 10^3$  tế bào/g bùn, chỉ chiếm khoảng 28,3% so với tổng vi khuẩn.
- Mật độ *Vibrio* dao động từ  $2,1 \times 10^2$  đến  $1,5 \times 10^5$  CFU/g trong bùn và từ 26 CFU/mL đến  $2,3 \times 10^2$  CFU/mL trong nước và có khuynh hướng tăng dần trong quá trình nuôi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balmelle, B., 1992. Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification, *Water Sci. Technol.* 26: 1018-1025.
- Banwart, G.J. 2000. Basic food microbiology. Department of Microbiology. The Ohio State University.
- Bock, E., Koops, H.P. and Harms, H. 1986. Cell Biology of Nitrifying bacteria, p. 17-38. In J. I. Prosser (ed.), *Nitrification Spec. Publ. Gen. Microbiol.*, vol. 20. IRL, Oxford; pp 17-38.
- Chinabut S., T. Somsiri, F.Md. Yusoff, Dang thi Hoang Oanh, S. Mohamed, G. Huys, K. Barti. Nguyen Thanh Phuong, J. Swings and A. Teal. 2003. A simple device for sampling soft pond bottom sediment. *Aquaculture* 258 (2006) 650– 654.
- Degrange, V. and R. Bardin, 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* population in soil by PCR, *Environ. Microbiol.* Vol. 61, pp. 2093-2098.
- Dergange, V; Bardin, R., 1998. Detection and Counting of *Nitrobacter* Population in Soil by PCR.
- Grommen R. and Vertraete, 2003. Nitrate removal in aquaria system: use of electrochemically generated hydrogen gas as electron donor for denitrification. In: *Proceeding of the 17<sup>th</sup> Forum for Applied Biotechnology. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, Gent 68 (2a), 159-162.

- Guerrero, M.A and Jones, R.D; 1996a. Photoinhibition of Marine Nitrifying Bacteria. Wavelength-dependent response. Mar. Ecol.-Prog.Ser.141, 183-192.
- Harwood, C. and Archibald, A., 1990. Growth, maintenance and general techniques. In: Harwood, C.R., Cutting, S.M. (Eds), Molecular Biological Methods for *Bacillus*. Wiley, Chichester, England, pp. 1-26..
- Hastings, J.W. and K.H. Nealson. 1981. The symbiotic luminous bacteria. In: The Prokaryotes II. Springer- Verlag, New York, 1960 pp.
- HesselsØe, M., Pederson, A., Bundgaard, K. K. and Sørensen, J., 2001. Nitrification hot-spots around degrading red clover (*Trifolium patense*) leave in soil. Biol. Fertil. Soil 33, 238-245.
- Herbert, R.A., 1999. Nitrogen Cycling in Coastal Marine Ecosystems.
- Huys, G. 2002. Preservation of bacteria using commercial cry preservation systems. Standard Operation Procedure, Asia resist.
- Huys, G. 2003. Sampling and sample processing procedures for the isolation of aquaculture associated bacteria.
- Leonel, J. Occhoe – Solano and Jorge Olmos-Soto, 2005. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. In Food Microbiology 23 (2006) 519-525.
- Lin, C. K. 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand, p. 13-23. In C. L. Browdy, and J. S. Hopkins (ed.), Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Moriarty, D.J.W., 1996. Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. Infofish Int. 4, 29-33.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358.
- Moriarty, David J. W., 1999. Disease control in shrimp Aquaculture with probiotic bacteria. Biomanagement system Pty. Ltd., 315 Main road, Wellington point. Queensland 4160 Australia and Department of Chemical Engineering. The University of Queensland. Qld. 4072 Australia.
- Nguyễn Lân Dũng. 1983. Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp Hà Nội.
- Olson, R. J., 1981a. Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum. J. mar Res. 39: 227-238.
- Parry, J.M., P.C.B. Turbbull and J.R. Gibson, 1983. A colour Atlas of *Bacillus* species. Wolfe Medical Publication, Ltd., London.
- Pickering, R. J., 1975. Analytical Methods-Nitrifying bacteria (Most-Probable- Number, MPN, method).
- Rengpipat, S., and S. Rukpratanporn. 1998. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), p. 193. In Book of Abstracts of the Fifth Asian Fisheries Forum - International Conference on Fisheries and Food Security Beyond the Year 2000. Asian Fisheries Society, Chiang Mai, Thailand.
- Rennie, R.J; Schmidt, E.L., 1977. Immunoflou-Rescence Studies of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* Populations in Soils.
- Sharma, B., Ahlert, R.C., 1977. Nitrification and nitrogen removal. Water Res. 11, 897-925.
- Sonnenshein, A.L., Losick, R., Hoch, J.A., 1998. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for microbiology, Washington, DC, 987pp.
- Vanzella, A., Gurreno, M.A., Jones, R.D., 1985. Effects of CO<sub>2</sub> light on Ammonium and Nitrite oxidation by Chemolithotrophic Bacteria. Mar. Ecol.-Pcol. Ser. 57, 69-76.

- Vaseeharan, B and Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio spp* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. In The society for Applied Microbiology, 36, 83-87.
- Verschuere, L., Rombaut G., Sorgeloos P., & Verstraete W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 64, 655-671.
- Yoshioko, T., Saijo, Y (1984). Photoinhibition and recovery of oxidizing bacteria and Non-oxidizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Tokyo 39: 151-166.
- Yoshioka, T., Saijo, Y., 1984. Photoinhibition and recovery of  $\text{NH}_4^+$  -oxidizing bacteria and  $\text{NO}_2^-$  oxidizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Tokyo 30: 151-166.
- Zimmerman, S.B., C.D. Schwartz, R.L. Monaghan, B.A. Pleak, B. Weissberger, E.C. Gifillan, S. Mochales, S. Hernander, S.A. Currie, E. Tejera and E.O Stapley, 1987. Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *J Antibiotics* 40 (12): 1677-1681.