



TỐI ƯU HÓA VÀ ỨNG DỤNG VI KHUẨN TẠO CHẤT KẾT TỤ SINH HỌC TRÊN MÔI TRƯỜNG PROTEIN VÀO XỬ LÝ NƯỚC AO NUÔI CÁ TRA Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Đặng Thị Huỳnh Mai¹, Hà Thanh Toàn² và Cao Ngọc Điệp¹

¹ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Thông tin chung:

Ngày nhận: 27/11/2013

Ngày chấp nhận: 26/02/2014

Title:

Optimization and application of bioflocculant-producing bacteria in protein medium to catfish pond water treatment in the laboratory

Từ khóa:

Ao nuôi cá tra, huyền phù kaolin, kết tụ sinh học, vi khuẩn tạo chất kết tụ, xử lý nước thải ao cá

Keywords:

Bioflocculation, bioflocculant-producing bacteria, catfish pond, catfish pond waste treatment, kaolin suspension

Among the bioflocculant-producing bacteria in protein medium isolated from sedimentary catfish pond in 10 provinces of Mekong delta, three strains having flocculating rates over 70% were selected to study the factors which influenced on the flocculation rates. The maximum bioflocculating rates were recorded at an optimum pH of 6 in the presence of NaCl. Starch, glutamic acid, KCl were used as the best carbon, nitrogen and mineral source for these bioflocculant-producing strains. Besides, the dosage which gave the highest flocculation rates was low (0,08% - 0,10%) with all examined isolates. After being optimized, the highest flocculating rates of strains *Bacillus megaterium* AGT08P, *Bacillus megaterium* DTT07P and combination of DTT07P-AGT08P that achieved for kaolin suspension were 80,23% - 83,17% and 50,77% - 52,75% for catfish pond water. When applying to catfish pond water treatment in the laboratory, these strains and combination reduced the TSS and COD content in water of catfish pond in the range of 48,19% - 68,60% and 31,81% - 63,27% in comparison to those of the control, respectively.

TÓM TẮT

Trong số các dòng vi khuẩn tạo chất kết tụ sinh học trên môi trường protein phân lập từ bùn đáy ao nuôi cá tra ở 10 tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long, 3 dòng vi khuẩn có tỷ lệ kết tụ cao hơn 70% được chọn để khảo sát những yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ kết tụ. Tỷ lệ kết tụ sinh học cao nhất được ghi nhận ở pH tối ưu là 6 với sự hiện diện của NaCl. Tinh bột, acid glutamic, KCl được sử dụng như nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ tốt nhất cho các dòng vi khuẩn này. Ngoài ra, liều lượng sử dụng để cho tỷ lệ kết tụ cao nhất đối với các dòng khảo sát đều thấp, chỉ từ 0,08% - 0,10%. Sau khi được tối ưu hóa, tỷ lệ kết tụ cao nhất của các dòng vi khuẩn *Bacillus megaterium* AGT08P, *Bacillus megaterium* DTT07P và tổ hợp của DTT07P-AGT08P đạt được trong huyền phù kaolin là 80,23% - 83,17% và 50,77% - 52,75% trong nước ao nuôi cá tra. Khi ứng dụng vào xử lý nước ao nuôi cá tra ở quy mô phòng thí nghiệm, các dòng và tổ hợp vi khuẩn này đã làm giảm lượng TSS và COD trong nước ao lần lượt là 48,19% - 68,60% và 31,81% - 63,27% so với đối chứng.

1 GIỚI THIỆU

Với điều kiện tự nhiên thuận lợi, kỹ thuật không quá khó, nghề nuôi cá tra đã phát triển khá mạnh ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) và cá

tra đã trở thành loài thủy sản có lượng xuất khẩu nhiều nhất trong các loài cá nuôi nước ngọt. Tuy nhiên, thực tế cho thấy nuôi cá với quy mô công nghiệp đã có tác động rất lớn đến môi trường do thức ăn dư thừa, chất thải trong quá trình trao đổi

chất, các hóa chất sử dụng... bị tích góp lại trong nước và nền đáy và nhanh chóng chuyển hóa thành amonium, nitrate, phosphate... dưới tác động của vi sinh vật và các quá trình phân hủy làm cho môi trường nước bị ô nhiễm (Trương Thị Nga, 2012). Các nghiên cứu của Foster và Gross (1998) cho thấy cá da trơn chỉ hấp thu được 27-30% nitrogen (N), 16 - 30% phosphor (P) và khoảng 25% chất hữu cơ từ thức ăn, theo các nghiên cứu do Châu Minh Khôi *et al.* (2012) thì hàm lượng N và P hòa tan trong các ao nuôi cá tra cao gấp nhiều lần so với tiêu chuẩn Việt Nam của Bộ Tài nguyên và Môi trường năm 2008. Để xử lý nước, quy trình kết tụ sinh học được đề nghị áp dụng vì kết tụ là công đoạn ban đầu cần thiết, giúp loại bỏ các tạp chất, tạo thuận lợi cho các công đoạn xử lý sau với lợi điểm là đầu tư cơ sở hạ tầng ít, thời gian xử lý ngắn và chất kết tụ sinh học tiết ra từ vi sinh vật dễ phát triển đạt sinh khối cao, ít tốn kém, có thể bị phân hủy bằng con đường sinh học nên không gây hại cho người và sinh vật khác, không gây ô nhiễm môi trường. Tuy nhiên, hiệu quả kết tụ phụ thuộc vào đặc tính của từng giống loài vi sinh vật tạo chất kết tụ cũng như chịu ảnh hưởng của các yếu tố như chất dinh dưỡng, điều kiện nuôi cấy, điều kiện của môi trường... Vì vậy, cần thiết phải xác định được các điều kiện tốt nhất đối với các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn để kết tụ đạt tỷ lệ cao nhất; từ đó chọn được một số dòng, tổ hợp vi khuẩn hiệu quả, bước đầu ứng dụng vào xử lý nước ao nuôi cá tra ở Đồng bằng sông Cửu Long trong quy mô phòng thí nghiệm.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Tuyển chọn các dòng vi khuẩn hiệu quả cao

Từ các dòng vi khuẩn tạo chất kết tụ trên môi trường protein phân lập từ các mẫu nước ao nuôi cá tra ở 10 tỉnh ĐBSCL, chọn 3 dòng vi khuẩn có tỷ lệ kết tụ cao nhất. Nuôi các dòng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường lòng tương ứng (Hazana *et al.*, 2008).

2.2 Xác định các điều kiện để kết tụ cao nhất

2.2.1 Ảnh hưởng của pH

Từ các dòng vi khuẩn tuyển chọn, đánh giá khả năng kết tụ với huyền phù kaolin ở những giá trị pH: 5, 6, 7, 8, 9 (dựa theo phương pháp của Gong *et al.*, 2008). Chuẩn bị 5 bình chứa dung dịch kaolin (5g/L) và CaCl₂ (1%) theo tỷ lệ 9:1. Điều chỉnh pH ở từng bình theo các giá trị trên. Cho vào ống nghiệm dung dịch kaolin (kaolin + CaCl₂) và

0,1% dịch vi khuẩn (mật số 1- 4.10⁸ CFU/ml). Khuấy hỗn hợp trong 5 giây trên máy khuấy và giữ yên trong 5 phút. Lấy phần trong phía trên đem đo chỉ số OD ở bước sóng 550 nm. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng dịch vi khuẩn. Các nghiệm thức được bố trí ngẫu nhiên, thực hiện 3 lần lặp lại.

Tỷ lệ kết tụ được tính theo công thức (Deng *et al.*, 2003):

Tỷ lệ kết tụ = (OD đối chứng - OD vi khuẩn) / OD đối chứng x 100

Xác định giá trị pH, ở đó tỷ lệ kết tụ cao nhất (theo từng dòng vi khuẩn).

2.2.2 Ion kim loại hỗ trợ kết tụ

Khảo sát ảnh hưởng của KCl, NaCl, CaCl₂, MgSO₄, MnSO₄ lên khả năng tạo chất kết tụ của vi khuẩn (theo Gong *et al.*, 2008). Chuẩn bị 5 bình chứa dung dịch kaolin (5g/L) và dung dịch 1% từng loại muối kim loại trên theo tỷ lệ 9:1. Điều chỉnh pH ở giá trị cho tỷ lệ kết tụ cao nhất. Cho vào ống nghiệm dung dịch kaolin và muối kim loại và 0,1% dịch vi khuẩn (mật số 1- 4.10⁸ CFU/ml). Các bước tiếp theo tương tự như trên. Xác định ion kim loại cho hiệu quả kết tụ cao nhất đối với từng dòng vi khuẩn.

2.2.3 Các nguồn dinh dưỡng: carbon, nitrogen, khoáng vô cơ

Nuôi vi khuẩn trong môi trường có chứa các nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ khác nhau để tìm môi trường có nguồn dinh dưỡng tốt nhất (theo Gong *et al.*, 2008).

Thí nghiệm có 48 nghiệm thức khác nhau cho mỗi dòng vi khuẩn tuyển chọn. Mỗi nghiệm thức là 1 môi trường có 3 nguồn carbon, nitrogen, khoáng (Thí dụ: nghiệm thức mã số 1 chứa glucose, acid glutamic, KCl; nghiệm thức số 2 chứa glucose, acid glutamic, FeCl₃; nghiệm thức số 48 chứa tinh bột, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ + KH₂PO₄...). Vi khuẩn được nuôi trong ống 50 ml, lắc trên máy với vận tốc 150 vòng/phút và để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 27° C trong 4 ngày. Sau đó tiến hành xác định tỷ lệ kết tụ với huyền phù kaolin theo các điều kiện cho hiệu quả kết tụ cao nhất về pH, ion kim loại đã xác định ở các thí nghiệm trước. Sử dụng dịch vi khuẩn (mật số 1- 4. 10⁸ CFU/ml) với liều lượng theo tỷ lệ 0,1%. Mẫu đối chứng không chủng dịch vi khuẩn. Các nghiệm thức được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Xác định môi trường có nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ tốt nhất cho sự phát triển của từng dòng vi khuẩn.

Bảng 1: Các nguồn carbon, nitrogen, khoáng vô cơ trong môi trường nuôi vi khuẩn

Nguồn Carbon	Nguồn Nitrogen				Nguồn khoáng vô cơ
	A. glutamic	Yeast extract	Urea (NH ₄) ₂ SO ₄		
	(5%)	(0,05%)	(0,05%)	(0,05%)	
	(4)	(5)	(6)	(7)	
Glucose (1%) (1)	1	5	9	13	KCl (0,5%) (8)
	2	6	10	14	FeCl ₃ (0,5%) (9)
	3	7	11	15	CaCl ₂ (0,5%) (10)
	4	8	12	16	K ₂ HPO ₄ (0,2%) + KH ₂ PO ₄ (0,5%) (11)
Sucrose (1%) (2)	17	21	25	29	KCl (0,5%) (8)
	18	22	26	30	FeCl ₃ (0,5%) (9)
	19	23	27	31	CaCl ₂ (0,5%) (10)
	20	24	28	32	K ₂ HPO ₄ (0,2%) + KH ₂ PO ₄ (0,5%) (11)
Tinh bột (1%) (3)	33	37	41	45	KCl (0,5%) (8)
	34	38	42	46	FeCl ₃ (0,5%) (9)
	35	39	43	47	CaCl ₂ (0,5%) (10)
	36	40	44	48	K ₂ HPO ₄ (0,2%) + KH ₂ PO ₄ (0,5%) (11)

Ghi chú: các số từ 1-48 là mã số của môi trường

2.2.4 *Liều lượng vi khuẩn sử dụng*

Đánh giá khả năng tạo chất kết tụ của từng dòng vi khuẩn ở những liều lượng khác nhau với các tỷ lệ 0,08; 0,09; 0,1; 0,11; 0,12; 0,2%. Chuẩn bị dung dịch kaolin và muối kim loại như các thí nghiệm trên với giá trị pH và ion kim loại thêm vào cho hiệu quả kết tụ cao nhất. Cho vào ống nghiệm dung dịch kaolin (kaolin + muối kim loại) và dịch vi khuẩn (mật số 1- 4.10⁸ CFU/ml) với từng liều lượng theo tỷ lệ 0,08; 0,09; 0,1; 0,11; 0,12; 0,2%. Các bước tiếp sau thực hiện như trên. Xác định liều lượng vi khuẩn sử dụng để đạt tỷ lệ kết tụ cao nhất đối với từng dòng vi khuẩn.

2.3 *Xác định các dòng, tổ hợp hiệu quả cao*

Với các dòng vi khuẩn tuyển chọn, phối hợp lại để tạo tổ hợp. Mỗi tổ hợp gồm 2 dòng vi khuẩn khác nhau. Thực hiện thí nghiệm tính tỷ lệ kết tụ trong huyền phù kaolin theo các điều kiện về pH môi trường, ion kim loại hỗ trợ, các nguồn dinh dưỡng, liều lượng vi khuẩn sử dụng đã được xác định để có tỷ lệ kết tụ cao nhất. Chọn các dòng và tổ hợp có tỷ lệ kết tụ cao hơn cả. Lặp lại thí nghiệm tương tự rồi thay dung dịch kaolin bằng nước ao nuôi cá tra ở 2 địa điểm khác nhau nhằm khẳng định lần nữa các dòng, tổ hợp hiệu quả cao để đưa vào ứng dụng.

2.4 *Ứng dụng vào xử lý nước ao nuôi cá*

Thí nghiệm ứng dụng vi khuẩn tạo chất kết tụ sinh học trên môi trường protein vào xử lý nước ao nuôi cá tra được thực hiện bước đầu ở quy mô phòng thí nghiệm với thể tích thử nghiệm là 100L. Sử dụng các dòng, tổ hợp vi khuẩn hiệu quả được tuyển chọn và các điều kiện tốt nhất được điều chỉnh như đã xác định ở trên. Khuấy đều nước ao

trong thùng chứa bằng tay với cây gỗ cứng hoặc tre (đường kính ≈ 4 cm, dài ≈ 160 cm) với tần số khuấy 60 vòng/phút trong 5 phút và để lắng sau 30 phút. Mẫu đối chứng không chủng dịch vi khuẩn. Nghiệm thức được thực hiện 3 lần lặp lại. Nước ao cá được đo TSS, COD trước và sau khi xử lý với vi khuẩn để xác định hiệu quả của các dòng, các tổ hợp vi khuẩn tạo kết tụ.

* Các số liệu kết quả được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.

3 **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

3.1 **Kết quả tuyển chọn các dòng vi khuẩn tạo chất kết tụ trên môi trường protein**

Từ các dòng vi khuẩn tạo chất kết tụ hiệu quả trên môi trường protein, chọn ra 3 dòng vi khuẩn có tỉ lệ kết tụ > 70% (Bảng 2).

Bảng 2: Các dòng vi khuẩn có tỉ lệ kết tụ cao

Số TT	Dòng vi khuẩn	Tỉ lệ kết tụ %
01	AGT08P	72,00
02	BTT24P	67,50
03	CTT04P	65,00
04	DTT07P	74,25
05	HGT06P	73,00
06	KGT15P	55,75
07	STT05P	64,00
08	TGT03P	67,50
09	TVT05P	62,50
10	VLT02P	65,50

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy 3 dòng AGT08P, DTT07P, HGT06P được chọn để xác định các điều kiện thích hợp cho tỉ lệ kết tụ cao nhất, từ đó chọn ra dòng, tổ hợp hiệu quả hơn cả ứng dụng vào xử lý nước ao.

Bằng phương pháp giải trình tự các đoạn 16S rDNA và so sánh để tìm trình tự tương đồng với

các dòng lưu trữ trên ngân hàng gen NCBI, định danh được các dòng tuyển chọn là: *Bacillus megaterium* AGT08P, *Bacillus megaterium* DTT07P và *Bacillus* sp. HGT06P.

3.2 Các điều kiện để kết tụ cao nhất

3.2.1 pH của môi trường

Từ các dòng vi khuẩn tuyển chọn, đánh giá khả năng kết tụ với huyền phù kaolin ở những giá trị pH: 5, 6, 7, 8, 9. Kết quả ở Bảng 3 cho thấy dòng vi khuẩn AGT08P có tỉ lệ kết tụ cao và khác biệt không ý nghĩa ở pH = 5, 6, 9; tương tự dòng HGT06P có tỉ lệ kết tụ cao ở pH = 6, 7, 9 và khác biệt không ý nghĩa thống kê; dòng DTT07P có tỉ lệ kết tụ cao nhất ở pH = 6 và khác biệt có ý nghĩa với các giá trị pH = 5, 7, 8, 9. Một điều cần lưu ý là các dòng đều có tỉ lệ kết tụ tăng từ pH 5 đến pH 6; cao nhất ở pH = 6; sau đó tỉ lệ kết tụ giảm dần ở pH 7, 8. Tuy nhiên, đến pH = 9 thì tỉ lệ kết tụ lại có sự gia tăng. Điều này cũng tương tự ghi nhận của Cosa (2010) ở dòng vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. Pinky, tỉ lệ kết tụ tăng theo sự gia tăng pH và đạt tối đa ở pH 7 (72,4%); sau đó hoạt động kết tụ giảm khi pH tăng dần đến giá trị pH = 11; tuy nhiên ở pH = 12 hoạt động kết tụ gia tăng lần nữa ở mức khá cao (70%). Kết quả tương tự cũng ghi

nhận được với chất kết tụ sinh học PG. a21Ca khi hiệu quả kết tụ thấp ở pH < 7 và có hoạt động tối ưu ở pH trung tính (90%); hoạt động của chất kết tụ sinh học này giảm xuống khi pH tăng lên hơn 7 và lại gia tăng đến khoảng 80% ở pH 10, sau đó giảm hẳn xuống (Pan, 2009). Theo Salehizadeh và Shojaosadati (2001) thì các kết quả này có thể do pH ban đầu của môi trường có tác động hoặc ảnh hưởng đến việc ổn định điện tích bề mặt và tiềm năng oxy hóa - khử của chất kết tụ vì có thể tác động đến việc hấp thu chất dinh dưỡng và phản ứng tạo enzyme của sinh vật. Tuy nhiên, điều này có thể khác biệt ở các dòng vi khuẩn khác nhau. Cũng từ các kết quả ở Bảng 3, chọn pH = 6 để thực hiện cho các thí nghiệm tiếp sau để thuận tiện cho việc phối hợp các dòng. Kết quả này cũng tương tự khi Dermim *et al.* (1999) phân lập *Klebsiella* sp. từ chất thải đô thị tạo chất kết tụ trong huyền phù kaolin 4 g/l với hiệu quả kết tụ cao nhất ở pH 6,0 hoặc như hỗn hợp gồm 2 giống vi khuẩn *Staphylococcus* sp. và *Pseudomonas* sp. tạo chất kết tụ sinh học MMF1 có tỉ lệ kết tụ tốt nhất ở pH 6,0 (Zhi-Qiang *et al.*, 2007). Giá trị này cũng phù hợp với môi trường nước ao nuôi cá tra, thường có pH là 6 - 7.

Bảng 3: Tỉ lệ kết tụ của các dòng vi khuẩn theo các giá trị pH

pH VK	5		6		7		8		9	
	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %
AGT08P	72,07a	72,96a	68,55	bc	67,02	c	70,75	ab		
DTT07P	59,83	d	74,19a		68,47	b	62,94	c	69,22	b
HGT06P	63,15	c	72,31a		68,61	ab	68,16	b	69,43	ab

Ghi chú: Trên từng dòng vi khuẩn, những số theo sau cùng một chữ khác biệt không ý nghĩa với độ tin cậy 95%

3.2.2 Ion kim loại hỗ trợ kết tụ

Xác định ảnh hưởng của KCl, NaCl, CaCl₂, MgSO₄, MnSO₄ lên khả năng tạo chất kết tụ của vi khuẩn. Bảng 4 cho thấy dòng vi khuẩn AGT08P có tỉ lệ kết tụ cao và khác biệt không ý nghĩa thống kê khi thêm CaCl₂ hoặc NaCl vào môi trường; dòng DTT07P chỉ có KCl là khác biệt còn 4 khoáng CaCl₂, NaCl, MnSO₄, MgSO₄ đều cho tỉ lệ kết tụ khác biệt không ý nghĩa; đối với dòng HGT06P thì các tỉ lệ kết tụ cao và khác biệt không ý nghĩa khi cho CaCl₂, NaCl, MnSO₄ vào môi trường. Các kết

quả này cũng tương tự với kết quả của Zheng *et al.* trên dòng *Bacillus* sp., tỉ lệ kết tụ gia tăng với các ion Ca²⁺, Mn⁺ hoặc ở dòng *Aeromonas* sp. (Li *et al.*, 2007), tỉ lệ kết tụ cao với các ion Ca²⁺, Na⁺. Điều này cho thấy, thông thường ion Ca²⁺ thích hợp để giúp gia tăng sự kết tụ cho nhiều dòng vi khuẩn khác nhau; tuy nhiên, không phải dòng vi khuẩn nào cũng cần có sự hiện diện của ion kim loại này, chúng vẫn có tỉ lệ kết tụ cao khi có muối kim loại khác hoặc không cần bổ sung ion kim loại nào (Deng *et al.*, 2003).

Bảng 4: Tỉ lệ kết tụ của các dòng vi khuẩn theo các ion kim loại thêm vào

Ion KL VK	CaCl ₂		NaCl		KCl		MnSO ₄		MgSO ₄	
	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %	Tỉ lệ kết tụ %
AGT08P	73,10a		72,30a		62,54c		67,69b		63,15c	
DTT07P	74,66a		73,75a		61,10b		74,84a		71,86a	
HGT06P	72,97a		72,01a		60,91c		72,42a		64,41b	

Ghi chú: Trên từng dòng vi khuẩn, những số theo sau cùng một chữ khác biệt không ý nghĩa với độ tin cậy 95%

3.2.3 Nguồn dinh dưỡng tốt nhất cho vi khuẩn

Với 48 tổ hợp có chứa các nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ khác nhau, dựa vào tỉ lệ kết tụ, tìm ra môi trường có nguồn dinh dưỡng tốt nhất cho sự phát triển của các dòng vi khuẩn tuyển chọn (Bảng 5). Kết quả cho thấy cả 3 dòng

AGT08P, DTT07P và HGT06P đều phát triển tốt ở môi trường của tổ hợp mã số 33. Tổ hợp này gồm các nguồn dinh dưỡng là tinh bột, acid glutamic và KCl. Các nguồn dinh dưỡng này đều dễ tìm và rẻ tiền vì vậy rất thuận tiện và không tốn kém nhiều khi nuôi vi khuẩn tăng sinh khối.

Bảng 5: Tỉ lệ kết tụ của các dòng vi khuẩn theo 48 môi trường dinh dưỡng

AGT08P		DTT07P		HGT06P	
Mã số môi trường	Tỉ lệ kết tụ%	Mã số môi trường	Tỉ lệ kết tụ%	Mã số môi trường	Tỉ lệ kết tụ%
33	71,13 a	33	75,44 a	33	70,64 a
39	65,22 a	43	74,59 a	1	70,64 a
41	62,87 a	20	66,18 ab	17	66,35 ab
23	60,16 a	17	60,46 bc	47	58,45 abc
20	45,90 b	35	57,22 bcd	40	57,77 abcd
43	43,69 bc	15	52,51 bcde	46	57,70 abcd
19	43,41 bcd	48	50,35 cdef	39	53,00 bcde
14	43,26 bcde	39	49,34 cdefg	37	52,79 bcde
17	42,98 bcdef	23	44,48 defgh	23	51,50 bcde
46	42,05 bcdefg	45	42,70 efghi	42	51,36 cde
21	38,70 bcdefgh	46	41,78 efghij	20	51,29 cde
5	36,49 bcdefghi	13	40,77 efghijk	14	51,09 cde
7	35,85 bcdefghij	14	40,69 efghijk	45	50,68 cde
37	35,64 bcdefghij	21	40,39 efghijk	43	50,41 cdef
9	35,00 bcdefghij	47	39,30 efghijkl	36	47,89 cdefg
36	34,85 bcdefghij	27	39,15 efghijkl	5	47,27 cdefg
24	34,21 bcdefghij	25	38,61 fghijkl	26	47,14 cdefg
22	34,00 bcdefghij	31	37,61 fghijkl	22	46,60 cdefgh
44	33,43 bcdefghij	3	37,53 fghijkl	41	46,46 cdefgh
26	32,64 bcdefghij	18	37,37 fghijkl	48	46,25 cdefgh
25	32,29 bcdefghij	16	36,99 fghijklm	38	46,25 cdefgh
16	32,29 bcdefghij	9	36,52 ghijklm	30	43,73 cdefghi
1	32,29 bcdefghij	24	36,22 ghijklm	13	43,73 cdefghi
18	31,72 cdefghij	37	35,52 hijklm	31	43,60 cdefghi
42	31,57 cdefghij	22	35,52 hijklm	10	43,60 cdefghi
29	30,43 cdefghij	11	35,44 hijklm	35	43,32 defghij
13	30,43 cdefghij	10	35,29 hijklm	27	42,64 efghij
47	29,44 defghij	44	34,83 hijklm	18	42,37 efghij
27	29,22 efghij	41	34,83 hijklm	15	42,37 efghij
38	29,08 fghij	42	34,36 hijklmn	29	42,30 efghij
15	28,15 ghij	30	34,36 hijklmn	9	41,96 efghij
48	28,15 ghij	26	34,29 hijklmn	2	41,55 efghij
30	28,15 ghij	40	33,28 hijklmn	25	41,28 efghij
6	27,51 hij	5	33,28 hijklmn	44	41,14 efghij
10	27,44 hij	12	33,13 hijklmn	7	40,74 efghij
32	27,16 hij	38	32,51 hijklmn	6	40,46 efghij
31	26,59 hij	19	32,20 hijklmn	21	39,92 efghijk
40	26,09 hij	36	31,27 hijklmn	32	39,78 efghijk
45	25,73 hij	4	30,35 ijklmn	24	38,96 efghijk
11	25,66 hij	28	30,19 ijklmn	11	38,83 efghijk
2	23,59 ij	6	29,88 ijklmn	8	35,69 fghijkl
28	23,52 ij	32	29,27 ijklmn	16	33,79 ghijkl
4	23,24 ij	29	28,34 jklmn	34	31,88 hijkl
3	22,95 ij	2	27,88 klmn	12	30,38 ijkl
8	22,81 ij	8	27,34 klmn	28	28,41 jkl
35	22,10 j	1	26,25 lmn	4	25,34 kl
12	21,88 j	7	23,40 mn	19	25,20 kl
34	04,99 k	34	20,85 n	3	22,34 l

Ghi chú: Trên từng dòng vi khuẩn, những số theo sau cùng một chữ khác biệt không ý nghĩa với độ tin cậy 95%

3.2.4 *Liều lượng vi khuẩn sử dụng*

Ở thí nghiệm phần 3.2.2, cả 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn có tỷ lệ kết tụ cao và khác biệt không có ý nghĩa trong cả 2 dung dịch huyền phù kaolin có thêm CaCl₂ hoặc NaCl vào. Vì vậy sẽ đánh giá khả năng tạo chất kết tụ của từng dòng vi khuẩn (mật số vi khuẩn 1- 4.10⁸ CFU/ml) ở những liều lượng khác nhau với các tỷ lệ 0,08; 0,09; 0,1; 0,11; 0,12; 0,2% trên cả 2 môi trường kaolin + CaCl₂ và kaolin + NaCl.

Bảng 6: Tỷ lệ kết tụ theo liều lượng vi khuẩn sử dụng trên 2 loại môi trường

Vi khuẩn	Liều lượng sử dụng	Kaolin + NaCl Tỷ lệ kết tụ %	Kaolin+CaCl ₂ Tỷ lệ kết tụ %
AGT08P	0,08%	70,67 a	51,02 bc
	0,09%	59,27 b	68,52 a
	0,10%	44,79 c	57,50 b
	0,11%	47,40 c	56,56 bc
	0,12%	40,81 c	56,09 bc
DTT07P	0,20%	17,53 d	47,81 c
	0,08%	79,94 a	73,13 b
	0,09%	77,64 abc	75,00 b
	0,10%	79,33 ab	74,38 b
	0,11%	76,34 bc	75,47 b
HGT06P	0,12%	74,81 cd	77,03 ab
	0,20%	72,44 d	80,47 a
	0,08%	51,38 b	61,56 b
	0,09%	49,85 b	64,92 ab
	0,10%	69,45 a	65,70 ab
	0,11%	50,00 b	64,92 ab
	0,12%	53,75 b	63,52 b
	0,20%	47,86 b	71,95 a

Ghi chú: Trên mỗi dòng vi khuẩn, ở từng loại môi trường, những số theo sau cùng một chữ khác biệt không ý nghĩa với độ tin cậy 95%

Kết quả ở Bảng 6 và kết hợp thống kê so sánh tỷ lệ kết tụ cao nhất trên từng loại môi trường của mỗi dòng vi khuẩn cho thấy 2 tỷ lệ kết tụ cao nhất của từng dòng vi khuẩn trên 2 môi trường kaolin + CaCl₂ và kaolin + NaCl khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, ở các tỷ lệ kết tụ cao nhất, liều lượng vi khuẩn sử dụng trên môi trường có NaCl đều ít hơn liều lượng sử dụng trên môi trường có CaCl₂, chỉ sử dụng từ 0,08% - 0,10%. Liều lượng này cũng tương tự trong nghiên cứu của Deng *et al.* (2003) với *Bacillus mucilaginosus* hiệu quả kết tụ có thể đạt đến 99,6% với huyền phù kaolin chỉ với liều lượng nhỏ là 0,1% đồng thời ít hơn rất nhiều so với kết quả của Shih *et al.* (2001), ở dòng *Bacillus licheniformis* X14 nếu sử dụng liều lượng vi khuẩn là 1% thì hoạt tính kết tụ đạt được 99,2%.

Từ kết quả này NaCl được chọn sử dụng cho các bước tiếp theo với các ưu điểm:

- NaCl thân thiện với môi trường hơn CaCl₂
- Đạt hiệu quả kinh tế hơn: NaCl rẻ tiền hơn CaCl₂, liều lượng vi khuẩn sử dụng ít hơn (ít tốn sinh khối hơn) mà vẫn cho tỷ lệ kết tụ cao.
- Cá tra có thể phát triển bình thường ở độ mặn 0,1% NaCl

3.3 Các dòng vi khuẩn, tổ hợp vi khuẩn hiệu quả cao

3.3.1 Xác định các dòng, các tổ hợp hiệu quả cao trong huyền phù kaolin

Từ 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn, phối hợp lại để tạo các tổ hợp. Có 3 nhóm tổ hợp là (1-2) gồm HGT06P và DTT07P; (1-3) gồm HGT06P và AGT08P; (2-3) gồm DTT07P và AGT08P (Bảng 7).

Bảng 7: Quy ước mã số các dòng vi khuẩn tuyển chọn

Dòng VK	HGT06P	DTT07P	AGT08P
Mã số quy ước cho dòng VK	1	2	3

Bảng 8: Kết quả so sánh tỷ lệ kết tụ của 3 dòng vi khuẩn và các tổ hợp vi khuẩn

Dòng vi khuẩn	Tỷ lệ kết tụ	Tổ hợp vi khuẩn	Tỷ lệ kết tụ
DTT07P	83,09 a	(2-3)	83,17 a
AGT08P	80,23 a	(1-2)	78,90 ab
HGT06P	71,88 b	(1-3)	69,06 c

Ghi chú: Những số theo sau cùng một chữ khác biệt không ý nghĩa với độ tin cậy 95%

Kết quả ở Bảng 8 cho thấy 2 dòng DTT07P, AGT08P có tỷ lệ kết tụ cao hơn 80%, khác biệt không ý nghĩa với độ tin cậy 95%; còn dòng HGT06P chỉ có tỷ lệ kết tụ là 71,88%. Tổ hợp của 2 dòng vi khuẩn này, mã số (2-3), cũng có tỷ lệ kết tụ cao hơn 80% và khác biệt không có ý nghĩa với tổ hợp mang mã số (1-2); trong khi đó, tổ hợp mã số (1-3) chỉ đạt tỷ lệ kết tụ là 69,06%. Từ các kết quả này chỉ chọn tổ hợp mã số (2-3) của DTT07P và AGT08P để kiểm tra tiếp, chuẩn bị đưa vào bước ứng dụng.

3.3.2 Kiểm tra các dòng, các tổ hợp vi khuẩn hiệu quả cao

Kiểm tra lại hiệu quả kết tụ của các dòng, tổ hợp vi khuẩn vừa được xác định ở trên bằng thí nghiệm với dung dịch kaolin một lần nữa. Tiếp đó, thay dung dịch kaolin bằng nước ao nuôi cá tra ở Ô Môn, Trà Vinh để kiểm tra hiệu quả của các dòng vi khuẩn, tổ hợp vi khuẩn vừa được xác định (Bảng 9).

Bảng 9: Kết quả kiểm tra các dòng, tổ hợp vi khuẩn hiệu quả cao

STT	Dòng, Tổ hợp	Tỉ lệ kết tụ %		
		Dung dịch Kaolin	Nước ao cá Ô Môn	Nước ao cá Trà Vinh
01	DTT07P	81,09 ab	52,75 a	52,29 a
02	AGT08P	80,13 b	52,06 a	50,77 a
03	HGT06P	72,52 c	42,95 b	43,12 b
04	DTT07P + AGT08P	81,85 a	51,20 a	51,37 a

Kết quả kiểm tra lại hiệu quả của các dòng, tổ hợp bằng dung dịch kaolin ở Bảng 9 tương tự như trên: vẫn là các dòng DTT07P, AGT08P và tổ hợp của DTT07P với AGT08P có tỉ lệ kết tụ cao hơn 80% (80,13% – 81,85%). Dòng HGT06P chỉ có tỉ lệ kết tụ là 72,52% và khác biệt có ý nghĩa thống kê với 2 dòng kia. Khi thay dung dịch kaolin bằng nước ao nuôi cá tra (ao cá ở Ô Môn và Trà Vinh), tỉ lệ kết tụ của các dòng vi khuẩn và tổ hợp vi khuẩn được chọn giảm xuống rõ rệt. Tuy nhiên kết quả này cũng phù hợp với kết quả ở trên là các dòng DTT07P, AGT08P và tổ hợp của DTT07P với AGT08P đều có tỉ lệ kết tụ cao, hơn 50% (50,77% - 52,75%). Đối với dòng HGT06P, tỉ lệ kết tụ chỉ từ 42,95% - 43,12% và khác biệt có ý nghĩa với 2 dòng DTT07P, AGT08P và với tổ hợp của DTT07P và AGT08P.

Từ các kết quả trên, chọn 2 dòng DTT07P, AGT08P và tổ hợp của DTT07P - AGT08P để thực hiện giai đoạn tiếp theo, ứng dụng vào xử lý nước ao nuôi cá tra ở quy mô phòng thí nghiệm. Các kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của Kaewchai và Prasertsan (2002) đã phân lập

được *Bacillus subtilis*, sử dụng để xử lý nước thải của nơi ép dầu cò cũng như với *Bacillus mucilaginosus* do Deng *et al.* (2003) phân lập từ các mẫu đất có tỉ lệ kết tụ đến 90% hay với các vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập từ bùn của hệ thống xử lý nước thải phía bắc Durban (Nam Phi) có khả năng làm giảm độ đục của nước sông Palmiet (Buthelezi *et al.*, 2009)...

3.4 Ứng dụng trong xử lý nước ao nuôi cá tra

Thí nghiệm ứng dụng vi khuẩn tạo chất kết tụ sinh học vào xử lý nước ao nuôi cá tra thực hiện bước đầu ở quy mô phòng thí nghiệm với thể tích thử nghiệm là 100 L. Ba ao nuôi cá tra được chọn thực hiện thí nghiệm là Cần Thơ 1, Cần Thơ 2 và Cần Thơ 3.

Sử dụng các dòng, tổ hợp vi khuẩn được tuyển chọn và các điều kiện tốt nhất được điều chỉnh như đã xác định ở trên. Nước của 3 ao thử nghiệm được đo TSS, COD trước và sau khi xử lý với vi khuẩn để xác định hiệu quả của các dòng, các tổ hợp vi khuẩn tạo kết tụ.

Bảng 10: Hàm lượng TSS, COD nước ao cá Cần Thơ 1, 2, 3 trước và sau xử lý với vi khuẩn

Ao	Dòng, Tổ hợp	TSS*		COD*	
		TSS mg/L	Tỉ lệ giảm %	COD mg/L	Tỉ lệ giảm %
Cần Thơ 1	QCVN 08:2008/ BTNMT, loại B1	50		30	
	Đối chứng (nước ao không xử lý)	60,50		44	
	DTT07P	26,50	56,20	21	52,27
	AGT08P	24,50	59,50	30	31,81
	DTT07P + AGT08P	19,00	68,60	21	52,27
Cần Thơ 2	QCVN 08:2008/ BTNMT, loại B1	50		30	
	Đối chứng (nước ao không xử lý)	124,5		49	
	DTT07P	57,00	54,22	21	57,14
	AGT08P	64,50	48,19	18	63,27
	DTT07P + AGT08P	61,50	50,60	31	36,73
Cần Thơ 3	QCVN 08:2008/ BTNMT, loại B1	50		30	
	Đối chứng (nước ao không xử lý)	152,50		52	
	DTT07P	67,00	56,07	29	44,23
	AGT08P	72,00	52,79	31	40,38
	DTT07P + AGT08P	77,50	49,18	34	34,62

* Kết quả phân tích tại Trung tâm Kỹ thuật và Ứng dụng Công nghệ, Sở Khoa học và Công nghệ TP. Cần Thơ

Kết quả ở Bảng 10 cho thấy hàm lượng TSS, COD của nước ở 3 ao đều cao hơn Quy chuẩn Việt Nam (TSS: 60,5;124,5; 152,5/50; COD: 44; 49; 52/30) cho thấy môi trường nước ao đã có sự ô nhiễm; thậm chí lượng TSS cao gấp 2-3 lần Quy chuẩn Việt Nam (QCVN) như ở nước ao Cần Thơ 2 và Cần Thơ 3. Tuy nhiên, các dòng vi khuẩn và tổ hợp vi khuẩn khi đưa vào xử lý đều làm giảm lượng TSS với tỉ lệ giảm từ 48,19 – 68,60%. Riêng đối với ao Cần Thơ 1, lượng TSS đã giảm thấp hơn QCVN. Các dòng và tổ hợp cũng làm giảm lượng COD với tỉ lệ giảm từ 31,81 – 63,27%.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Hai dòng vi khuẩn và tổ hợp được chọn trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả của nhiều tác giả trên thế giới, trong đó vi khuẩn tạo chất kết tụ đã được ứng dụng trong xử lý nước và nước thải từ các quá trình chế biến thực phẩm, sản xuất công nghiệp, hóa chất... Môi trường nuôi cấy tối ưu cho các dòng đều gồm những chất không khó tìm, giá thành thấp nên rất thuận tiện và ít tốn kém khi sử dụng. Kết quả ứng dụng với thể tích thử nghiệm là 100L cho thấy các dòng, tổ hợp được chọn có khả năng làm giảm lượng TSS trong nước ao từ 48,19% - 68,60% và giảm lượng COD từ 31,81% - 63,27% giúp khẳng định vai trò và tính khả thi của qui trình kết tụ sinh học và sẽ là cơ sở để tiếp tục ứng dụng vào các công đoạn xử lý nước ao nuôi cá Tra với quy mô rộng hơn.

4.2 Đề xuất

Tiếp tục nghiên cứu xác định thành phần chất kết tụ của các dòng vi khuẩn hiệu quả giúp nắm vững cơ chế kết tụ, từ đó có thể nâng cao tỉ lệ kết tụ hơn nữa.

Khảo sát, phối hợp với các nghiên cứu vi sinh vật khác để có thể xử lý nước ao nuôi cá tra triệt để, nâng cao hiệu suất nuôi cá tra công nghiệp, bảo vệ môi trường nước, tiến tới đảm bảo phát triển bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Buthelezi S. P., A. O. Olaniran and B. Pillay. 2009. Turbidity and microbial load removal from river water using bioflocculants from indigenous bacteria isolated from wastewater in South Africa. African Journal of Biotechnology. 8(14), pp. 3261-3266.
2. Châu Minh Khôi, Hứa Hồng Nhã và Châu Thị Nhiên. 2012. Sự tích tụ hàm lượng đạm,

lân vô cơ và hữu cơ trong nước và bùn đáy ao nuôi cá Tra thâm canh ở đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí khoa học 2012: 22a 17-24. Trường Đại học Cần Thơ.

3. Cosa Sekelwa. 2010. Assessment of bioflocculant production by some marine bacteria isolated from the bottom sediment of Algoa Bay – Submitted in fulfillment of the requirement for the degree of Master’s of Science – Department of Biochemistry and Microbiology – Faculty of Science and Agriculture – University of For Hare – Alice, South Africa.
4. Deng S. B., R.B. Bai, X.M. Hu and Q. Luo. 2003. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. Applied Microbial Biotechnology. 60, pp. 588-593.
5. Foster B.L. and K.L. Gross. 1988. Species richness in a successional grassland: Effects of nitrogen enrichment and plant litter. Ecology 79: 2593-2602.
6. Gong W.X., S.G. Wang, X.E. Su, X.W. Liu, Q.Y. Yue and B.Y. Gao. 2008. Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. Bioresour. Technol. 99, 4668-4674.
7. Hazana R., I. Norli, M.H. Ibrahim and A. Faziath. 2008. Flocculating activity of Bioflocculant producing bacteria isolated from Closed Drainage System (CDS) at Prai Industrial Zone, Penang, Malaysia. Proceedings of International Conference on Environmental Research and Technology (ICERT, 2008), pp. 422-425.
8. Kaewchai S. and P. Prasertsan . 2002. Screening and application of thermotolerantmicroorganisms and their flocculant for treatment of palm oil mill effluent. Songklanakarin Journal Science & Technology, 24(3), pp. 413-420.
9. Li, X. M., Q. Yang, K. Huang, G. M. Zeng, D. X. Liao, J. J. Liu and W. F. Long. 2007. Screening and Characterization of a Bioflocculant Produced by *Aeromonas* sp.. Biomedical and Environmental Sciences. 20, pp. 274-278.
10. Pan Y.. 2009. Research on flocculation property of bioflocculant PG.a21Ca. Modern Appl. Sci. 3(6): 106-112.

11. Salehizadeh H. and SA. Shojaosadati. 2001. Extracellular biopolymeric flocculants - recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 19: 371-385.
12. Shih I. L., Y.T. Van, L. C. Yeh. , H. G. Lin and Y. N. Chang. 2001. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresour Technol.* 78, pp. 267-272.
13. Trương Thị Nga. 2012. Nuôi cá tra thâm canh và chăn nuôi heo ở đồng bằng sông Cửu Long: hiện trạng ô nhiễm từ nguồn chất thải và các giải pháp triển vọng. Báo cáo trong hội thảo tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Cần Thơ. Tháng 03/2012.
14. Zheng Y., Z.L. Ye, X.L. Fang, Y.H. Li, W. M. Cai. 2008. Production and characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus* sp. F19. *Biol.* 99: 7686-7691.
15. Zhi-Qiang Z., B. Lin, S.Q. Xia, X.J. Wang and A.M. Yang. 2007. Production and application of a novel bioflocculant by multiple- microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. *Journal of environmental Sciences* 19(2007), 667-673.