

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ MẶN ĐẾN SỰ HÌNH THÀNH VÀ PHÁT TRIỂN CỦA BIOFLOC TRONG AO BÓN PHÂN

Nguyễn Văn Hòa¹, Đặng Kim Thanh, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Hồng Vân, Trương Chí Linh² và Phạm Thị Tuyết Ngân¹

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

² Học viên Cao học K19, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 19/11/2013

Ngày chấp nhận: 26/02/2014

Title:

The formation and development of biofloc in fertilized ponds at different salinities

Từ khóa:

biofloc, độ mặn, ao bón phân, tỉ lệ C:N, thành phần sinh hóa

Keywords:

Biofloc, salinity, fertilized pond, C:N ratio, proximate composition

ABSTRACT

This study aimed to determine the suitable salinity for the development and formation of biofloc in fertilized ponds. The experiment was conducted at four different salinities (35, 60, 80 and 100 ppt) with 3 replicates per treatment and lasted for 21 days. Earthen ponds with area of 150 m², water column of 30 cm were fertilized with chicken manure together tapioca to maintain the C:N ratio of ≥ 10 . Results showed that the environmental factors (temperature, dissolved oxygen, pH) were suitable for the formation and development of biofloc. The C:N ratio ranges from 5 to 9. The TOC content at 35 ppt (20.21 to 50.5 mg/L) was less than at higher salinity (40 to 74.89 mg/L). The mean value of TSS and VSS were 20 to 670 mg/L and 7 to 126.6 mg/L, respectively and there was no significant difference among the treatments at day 18 and 21 ($p > 0.05$). Total bacteria counts reached highest number at day 15 (4.1 log CFU/ml), the maximum volume of biofloc ranged from 0.4 to 0.5 ml and no significant difference among treatments ($p > 0.05$). *Vibrio*, *Bacillus*, *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* were found in all salinities, in which *Bacillus* presented with highest proportion. The ratio of un-known bacteria at salinity ≥ 60 ppt were very high (63-100%). At high salinity (80-100 ppt), floc size was smaller (32.5 - 61.5 μm wide; 61.3 - 97.9 μm long) than at low salinity (52.3 - 71.0 μm wide; 76.7 - 105.3 μm long). Proximate compositions analysis showed the low proportions of protein (8.5 to 17.4%) and lipid (0.65 to 1.08%), whereas ash content was very high (67.1 to 86.4%).

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm xác định độ mặn thích hợp cho sự phát triển và hình thành biofloc trong ao bón phân. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức độ mặn (35, 60, 80 và 100 ppt) và được lặp lại 3 lần, thời gian thí nghiệm là 21 ngày. Ao thí nghiệm có diện tích 150 m² với mực nước 30 cm và sử dụng phân gà + bột khoai mì để duy trì tỉ lệ C:N ≥ 10 . Kết quả thí nghiệm cho thấy các chỉ tiêu môi trường (nhiệt độ, oxy hòa tan, pH) nằm trong khoảng thích hợp cho sự hình thành và phát triển của biofloc. Tỷ lệ C:N dao động từ 5-9. Hàm lượng TOC thấp nhất ở 35 ppt (20,21-50,5 mg/L) và ở các độ mặn cao từ 40-74,89 mg/L. Hàm lượng TSS và VSS từ 20-670 mg/L và 7-126,6 mg/L và không có sự khác biệt giữa các độ mặn ở ngày 18 và 21 ($P > 0,05$). Mật độ vi khuẩn tổng đạt cao nhất vào ngày 15 (4,1 log CFU/ml), thể tích biofloc cao nhất là 0,4-0,5 ml và không có sự khác biệt giữa các độ mặn ($P > 0,05$). Có 4 nhóm vi khuẩn được phát hiện là *Vibrio*, *Baccillus*, *Nitrosomonas* và *Nitrobacter*, trong đó nhóm *Bacillus* luôn chiếm tỷ lệ cao ở tất cả các độ mặn. Tỷ lệ vi khuẩn chưa định danh ở độ mặn ≥ 60 ppt chiếm rất cao (63-100%). Ở độ mặn cao (80-100 ppt) kích thước hạt biofloc nhỏ hơn (rộng: 32,5-61,5 μm và dài: 61,3-97,9 μm) so với ở độ mặn thấp (rộng: 52,3-71,0 μm và dài: 76,7-105,3 μm). Phân tích thành phần dinh dưỡng của biofloc cho thấy tỷ lệ của protein (8,5-17,4%) và lipid (0,65-1,08%) đều thấp, trong khi đó, hàm lượng tro rất cao (67,1-86,4%).

1 GIỚI THIỆU

Biofloc (hay còn gọi là bông cặn sinh học) là hỗn hợp gồm nhiều loại vi sinh vật khác nhau gồm mảnh vụn hữu cơ, hạt keo, cation và các tế bào chết,... Trong nuôi trồng thủy sản, công nghệ biofloc có thể được ứng dụng như một phương pháp quản lý chất lượng nước, dựa vào sự phát triển và kiểm soát vi khuẩn dị dưỡng trong hệ thống nuôi với việc không hoặc ít thay nước (Avnimelech 2007; De Schryver *et al.*, 2008). Khi cộng đồng vi khuẩn phát triển, biofloc được hình thành (Jorand *et al.*, 1995; Hagraeves, 2006; Avnimelech, 2007; De Schryver *et al.*, 2008), sau đó biofloc có thể được động vật nuôi tiêu thụ như là một nguồn thức ăn, tạo thành một quá trình tái sử dụng chất dinh dưỡng trong hệ thống nuôi trồng thủy sản. Cung cấp tỷ lệ C:N thích hợp nhằm thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn dị dưỡng bằng cách đồng hóa ammonia trực tiếp từ môi trường nước để sản xuất protein cho tế bào (Avnimelech, 1999; Crab *et al.*, 2009). Trong điều kiện tỷ lệ C:N cao (10-20), vi khuẩn dị dưỡng là thành phần chủ yếu của biofloc sẽ đóng vai trò trong xử lý nước và sản xuất thức ăn tự nhiên, giảm chi phí thức ăn và xử lý chất thải (Kent *et al.*, 2011). Công nghệ BFT đã trở thành một công nghệ rất được ưa chuộng trong nuôi tôm thẻ chân trắng. Công nghệ này đã bước đầu thành công ở Belize (Chamberlain *et al.*, 2001), Ấn Độ (Taw, 2005), tôm sú ở Úc (Smith, 2008) và cá rô phi ở Israel (Avnimelech, 2007).

Nhìn chung, các nghiên cứu về biofloc tập trung trên một số đối tượng lợ mặn với độ mặn môi trường trong khoảng 30-35‰ như tôm thẻ chân trắng, tôm sú, cá rô phi,... Trong khi đó thành phần

Bảng 1: Hàm lượng P, C, N của phân gà và bột mì (% khối lượng khô)

Nguyên liệu	Độ ẩm	P	C	N	C:N
Bột khoai mì	10,92± 0,45	0,41 ± 0,11	72,14± 1,81	1,32± 0,09	54,61± 4,91
Phân gà	23,72± 2,04	4,25± 2,27	14,83± 2,06	1,88± 0,57	8,23± 2,05

2.3 Thu thập và phương pháp phân tích mẫu

Nhiệt độ, pH, oxy hoà tan đo bằng máy mỗi ngày vào lúc 7:00 h và 14:00 h.

Thu mẫu nước ở các nghiệm thức để tiến hành phân tích tổng carbon, tổng chất rắn lơ lửng và chất rắn lơ lửng bay hơi (phương pháp APPHA *et al.*, 1995): 1 lần/3 ngày, mẫu được thu vào lúc 7 h sáng. Thu 5 điểm trong ao, sau đó trộn đều và lấy mỗi chỉ tiêu một mẫu. Mẫu nước được trữ mát 4°C.

Tổng vi khuẩn (trong môi trường nước), thể tích biofloc: 1 lần/3 ngày

của biofloc gồm vi khuẩn, tảo, mùn bã hữu cơ,... có thể là thức ăn cho một số đối tượng ăn lọc sống ở độ mặn cao hơn (80-100 ppt) như *Artemia*, vốn là đối tượng ăn lọc không chọn lựa (Sorgeloos, 1986) chưa được quan tâm, do đó việc nghiên cứu sự hình thành biofloc ở các độ mặn khác nhau là rất quan trọng nhằm tìm ra độ mặn thích hợp để ứng dụng công nghệ BFT cho nghề nuôi *Artemia* trên ruộng muối.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trong 3 tuần từ ngày 06 đến 27 tháng 01 năm 2013 tại Trại Thực nghiệm Vĩnh Châu (Đại học Cần thơ), Phường Vĩnh Phước, Thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng.

2.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức (NT) độ mặn với 3 lần lặp lại: 35, 60, 80 và 100 ppt.

Các NT được bố trí trong các ao đất có diện tích: 150 m², mực nước 30 cm.

Ao thí nghiệm không lót bạt, không có mương quanh và không lắp hệ thống sục khí.

Chăm sóc và quản lý thí nghiệm: nước được cấp vào các ao thí nghiệm 1 lần/2-3 ngày. Bừa trực mỗi ngày hai lần vào sáng sớm và lúc giữa trưa.

Bổ sung phân gà và bột mì vào các ao nhằm duy trì tỉ lệ C:N ≥ 10, tính toán lượng sử dụng dựa vào cách tính Avnimelech (1999) với liều lượng:

- Phân gà: 1,5 kg/ao 150 m² (100kg/ha/3ngày).
- Bột mì: 0,3 kg/ao 150m² (20 kg/ha/3ngày)

Giá trị dinh dưỡng, kích thước biofloc: thu vào ngày 7, 14 và 21.

Đo kích thước hạt biofloc: thu mẫu biofloc vào chai nhựa 100 mL và cố định bằng formol với nồng độ từ 2-4%, sau đó mẫu được đo dưới kính hiển vi có thước đo.

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Phép phân tích ANOVA - STATISTICA, version 7.0 được sử dụng để tìm sự sai biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức p < 0,05. Chương trình Excel được sử dụng để tính

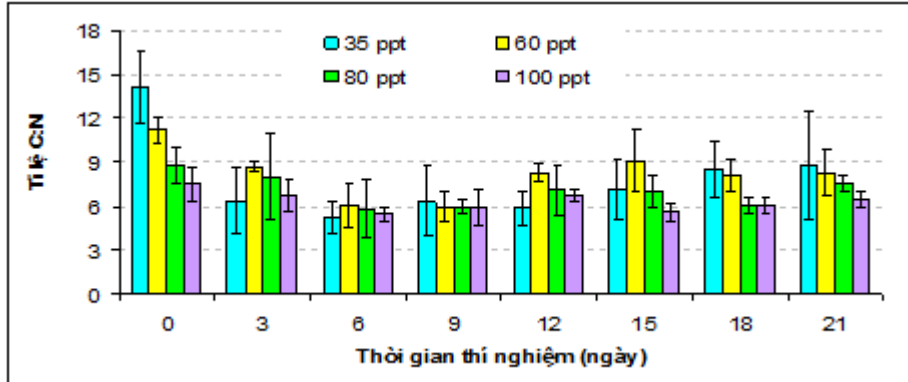
giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các số liệu và vẽ đồ thị về sự biến thiên của chúng.

3 KẾT QUẢ

Trong quá trình thí nghiệm các yếu tố môi trường như nhiệt độ nước dao động từ 27,8°C đến 30,7°C vào buổi sáng và 30,2-36,6 °C vào buổi chiều; pH trung bình giữa các nghiệm thức dao động từ 7,2-8,3. Hàm lượng oxy hòa tan giữa buổi

sáng (4,42-6,73 mg/L) chênh lệch không nhiều so với buổi chiều (5,58-10,92 mg/L).

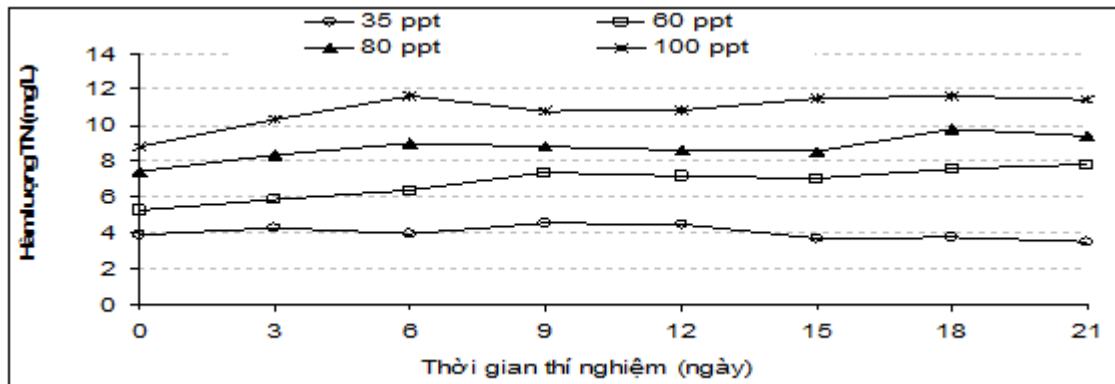
Tỷ lệ C:N có khuynh hướng giảm dần khi độ mặn tăng, kết quả ở Hình 1 cũng cho thấy ở NT 35 và 60 ppt, tỷ lệ C:N giảm mạnh trong 3 ngày đầu trong khi ở các NT có độ mặn cao hơn (80 và 100 ppt) thì tỷ lệ C:N tương đối ổn định và dao động từ 5-9.



Hình 1: Biến động hàm lượng C:N giữa các NT trong ao bốn phân

Hàm lượng TN trung bình ở các nghiệm thức trong thí nghiệm dao động từ 3,8-11,8 mg/L (Hình 2). Hàm lượng TN không có sự biến động lớn và tương đối ổn định ở các nghiệm thức qua các đợt thu mẫu, tuy nhiên có sự chênh lệch giữa

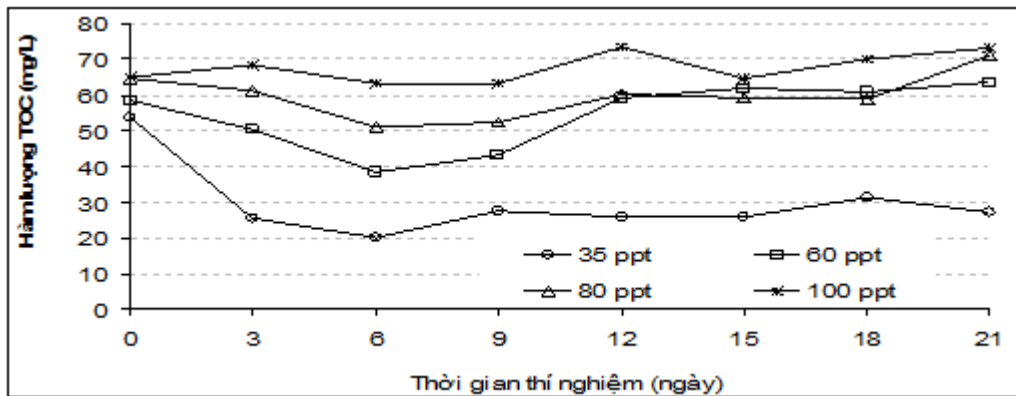
các NT và có xu hướng tăng khi độ mặn tăng. Cụ thể hàm lượng TN thấp nhất ở NT 35 ppt (3,8-4,2 mg/L) tăng dần theo độ mặn và đạt cao nhất ở NT 100 ppt (8,7-11,8 mg/L).



Hình 2: Biến động hàm lượng TN giữa các NT trong ao bốn phân

Tổng carbon (TOC = Total Organic Carbon): Hàm lượng TOC có khuynh hướng giảm từ ngày 0 đến ngày 6 của thí nghiệm sau đó có khuynh hướng tăng dần và tương đối ổn định cho đến cuối thí

nghiệm (Hình 3). Hàm lượng TOC ở các NT dao động trong khoảng 20,21-74,89 mg/L, thấp nhất là NT 35 ppt và cao nhất là 100 ppt.



Hình 3: Biến động hàm lượng TOC giữa các NT trong ao bốn phân

Đánh giá công nghệ biofloc trong ao bốn phân thông qua các thông số TSS, VSS, tổng vi khuẩn và thể tích biofloc cho thấy:

Tổng chất rắn lơ lửng (Total Suspended Solids-TSS): Hàm lượng TSS trong các NT dao động trong khoảng 20-672 mg/L. Nhìn chung, TSS có khuynh hướng giảm dần sau 9 ngày thí nghiệm sau

đó tăng trở lại và tương đối ổn định về cuối thí nghiệm. Kết quả thống kê cho thấy các NT gần như không khác biệt có ý nghĩa thống kê ngoại trừ NT 100 ppt (ngày 0) và NT 60 ppt (Ngày 15 và 18) khác biệt có ý nghĩa so với các NT còn lại (Bảng 2).

Bảng 2: Biến động hàm lượng TSS và VSS giữa các NT trong ao bốn phân (mg/L)

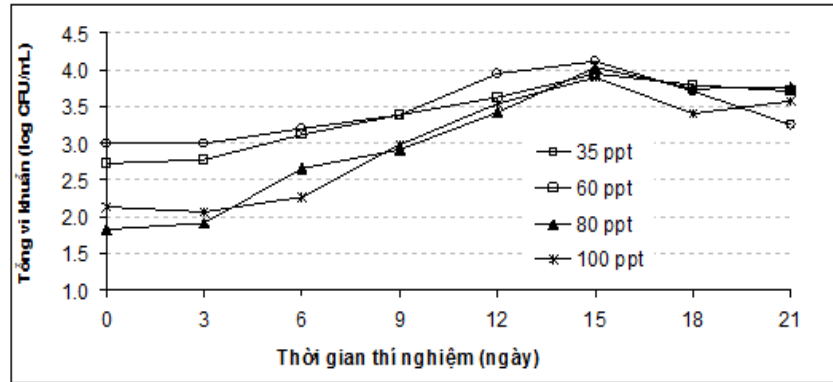
Ngày	TSS			
	35ppt	60ppt	80ppt	100ppt
0	256,7±66,0 ^a	157,5±10,6 ^a	98,5±30,5 ^a	672±38,3 ^b
3	60,0±0,0 ^a	20,0±5,7 ^a	207,5±38,9 ^{ab}	321,±97,6 ^b
6	55,0±7,1 ^b	30,0±0,0 ^a	37,5±3,5 ^{ab}	47,5±3,5 ^{ab}
9	59,5±21,9 ^a	75,5±0,7 ^a	68,0±11,3 ^a	70,0±14,1 ^a
12	100,0±28,3 ^a	370,0±70,7 ^b	137,5±38,9 ^a	107,5±3,5 ^a
15	56,8±4,6 ^a	365,0±35,4 ^b	205,0±7,1 ^a	51,0±1,4 ^a
18	162,5±3,5 ^a	170,0±56,6 ^a	170,0±42,4 ^a	108,5±4,9 ^a
21	80,0±28,3 ^a	135,0±7,1 ^a	145,0±21,2 ^a	82,5±3,5 ^a
Ngày	VSS			
	35ppt	60ppt	80ppt	100ppt
0	60,9±1,3 ^b	55,0±0,0 ^b	26,5±4,9 ^a	126,6±7,6 ^c
3	22,5±3,5 ^{ab}	8,0±0,0 ^a	57,5±10,6 ^c	39,5±6,4 ^{ab}
6	10,5±0,7 ^a	10,0±0,0 ^a	7,0±0,7 ^a	12,5±3,5 ^a
9	11,8±5,3 ^a	14,0±2,8 ^a	12,0±0,0 ^a	22,5±3,5 ^a
12	12,5±3,5 ^a	103,0±4,2 ^b	30,0±7,1 ^a	27,5±3,5 ^a
15	11,5±1,4 ^a	110,0±14,1 ^b	17,0±0,0 ^a	14,5±0,7 ^a
18	45,0±14,1 ^a	55,0±7,1 ^a	20,0±0,0 ^a	47,5±10,6 ^a
21	15,0±0,0 ^a	50,0±14,1 ^a	26,3±1,8 ^a	22,5±3,5 ^a

Các giá trị trong cùng một hàng có ký tự (a, b, c) khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa $p < 0,05$

Hàm lượng chất rắn lơ lửng bay hơi (Volatile Suspended Solids-VSS): Tương tự như biến động hàm lượng TSS, hàm lượng VSS trung bình ở các thí nghiệm thức giảm dần về cuối thí nghiệm và dao động trong khoảng 10-126,6 mg/L. Ở thí nghiệm thức 60 ppt, hàm lượng VSS tăng cao nhất ở ngày 12 và 15 tương ứng 103,0±4,2 mg/L và 110,0±14,1 mg/L và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các NT còn lại (Bảng 2).

Tổng vi khuẩn: Kết quả Hình 4 cho thấy ở độ mặn cao hơn (80, 100 ppt) vi khuẩn tăng trưởng chậm trong 9 ngày đầu thí nghiệm, sau đó tăng dần ở giai đoạn cuối của thí nghiệm và gần như không khác biệt với độ mặn thấp hơn (35, 60ppt). Đặc biệt, ngày thứ 15 của thí nghiệm thì số lượng tổng vi khuẩn đều tăng cao ở tất cả các thí nghiệm thức (3,8-4,1 log CFU/ml).

Hình 4: Biến động tổng vi khuẩn giữa các NT trong ao bốn phân



Khi phân tích thành phần vi khuẩn (Bảng 3) ở các nghiệm thức cũng cho thấy có 4 nhóm vi khuẩn được phát hiện là Vibrio, Baccillus, Nitrosomonas

và Nitrobacter, trong đó nhóm Bacillus luôn chiếm tỷ lệ cao ở tất cả các NT.

Bảng 3: Biến động tỉ lệ vi khuẩn/ tổng số vi khuẩn/ tổng số vi khuẩn theo thời gian

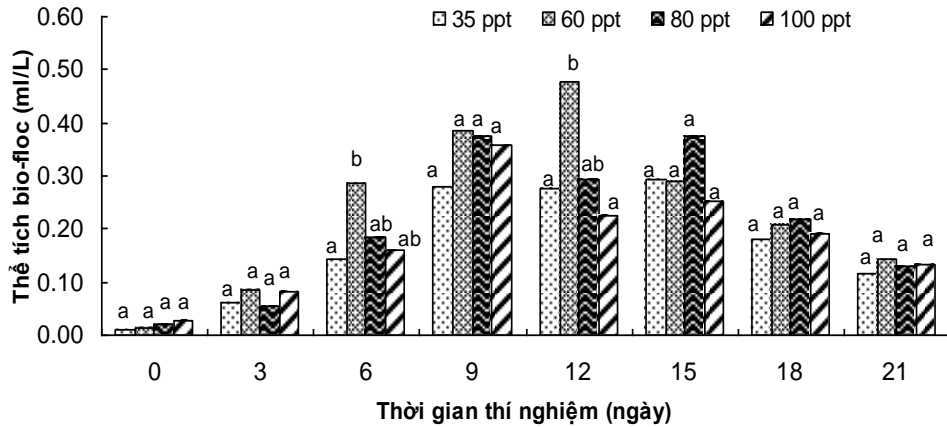
Ngày	0	3	6	9	12	15	18	21
35 ppt								
Vibrio	0	0	0	0	0.12	0.08	0.19	2.23
Bacillus	2.05	5.07	3.82	2.45	23.50	42.91	12.42	6.13
Nitrosomonas	0.00	0.00	0.00	2.45	1.27	2.08	1.55	5.01
Nitrobacter	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.85	3.11	6.68
Khác	97.95	94.93	96.18	95.09	75.00	54.09	82.72	79.95
60 ppt								
Vibrio	0	0	0	0	0.00	0.11	1.45	1.77
Bacillus	1.86	1.67	3.11	0.41	3.56	7.12	4.50	11.98
Nitrosomonas	0.00	0.00	0.00	1.24	1.66	1.61	1.13	1.57
Nitrobacter	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	0.57	1.45	1.77
Khác	98.14	98.33	96.89	98.35	94.55	90.58	91.47	82.91
80 ppt								
Vibrio	0	0	0	0	0.00	0.00	0.72	1.43
Bacillus	6.00	4.92	1.31	1.21	2.67	3.19	1.99	15.36
Nitrosomonas	0.00	0.00	0.00	1.21	1.15	1.22	1.27	1.25
Nitrobacter	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.38	1.09	1.25
Khác	94.00	95.08	98.69	97.58	95.80	95.22	94.93	62.84
100 ppt								
Vibrio	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus	0.00	0.00	0.00	0.00	1.78	0.77	13.35	21.24
Nitrosomonas	0.00	0.00	0.00	0.31	0.30	1.28	2.36	1.86
Nitrobacter	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.39	2.36	1.86
Khác	100.00	100.00	100.00	99.69	97.84	97.56	81.94	75.05

Kết quả cũng chỉ ra rằng tỉ lệ vi khuẩn Vibrio ở độ mặn cao thấp hơn so với độ mặn thấp, điển hình như NT 100 ppt không phát hiện nhóm Vibrio. Ngoài ra, Bảng 3 cũng cho thấy tỉ lệ vi khuẩn khác ở độ mặn ≥ 60 ppt chiếm rất cao (63-100%). Đây có thể là các dòng vi khuẩn ưa mặn (Halophilic bacteria) chưa được định danh trong mẫu nghiên cứu.

Thể tích của biofloc (bông cặn sinh học) của thí nghiệm được trình bày ở Hình 5.

Theo đó, thể tích của biofloc ở các NT 60, 80, 100 ppt xuất hiện ngay từ đầu và có khuynh hướng tăng dần và đạt mức cao từ ngày 9-15 sau đó giảm dần về cuối thí nghiệm. Thể tích biofloc tối đa là 0,4-0,5 ml/L và không có khác biệt lớn giữa các NT ($p > 0,05$).

Kích thước của biofloc cũng được đo thời gian thí nghiệm và được trình bày ở Bảng 4.



Hình 5: Biến động thể tích biofloc giữa các NT trong ao bốn phân

Bảng 4: Biến động kích thước hạt biofloc (x ± std, µm) trong thời gian thí nghiệm

Ngày	Nghiệm thức							
	35 ppt		60 ppt		80 ppt		100 ppt	
	Rộng	Dài	Rộng	Dài	Rộng	Dài	Rộng	Dài
7	62,6±30,2	93,6±30,4	59,8±25,9	76,7±27,4	51,6±28,8	81,4±46,6	39,7±11,4	74,5±30,5
14	71,0±20,4	105,3±30,9	57,5±22,3	102,6±36,4	61,5±30,5	97,9±51,4	37,1±26,1	61,3±36,8
21	52,3±18,7	98,2±55,7	55,3±19,4	80,6±41,6	32,5±19,6	66,3±28,3	33,8±15,8	49,7±22,2

Kích thước hạt biofloc trung bình ở các NT biến động trong khoảng 32,5-71,0 µm đối với chiều rộng và 49,7-105,3 µm đối với chiều dài. Trong cùng một nghiệm thức, biến động kích thước hạt biofloc tương đối lớn (ĐLC lớn). Theo thời gian nuôi, kích thước hạt biofloc có xu hướng tăng vào ngày 14 (ngoại trừ NT 100 ppt) sau đó giảm dần vào ngày 21. Nhìn chung, ở độ mặn cao (80-100 ppt) kích thước hạt biofloc dường như nhỏ

hơn (32,5-61,5 µm chiều rộng và 61,3-97,9 µm chiều dài) so với độ mặn thấp (52,3-71,0 µm chiều rộng và 76,7-105,3 µm chiều dài).

Khi phân tích giá trị dinh dưỡng của biofloc trong thời gian thí nghiệm cho thấy hàm lượng protein tương đối thấp dao động từ 8,5-17,4%, hàm lượng lipid 0,65-1,08%. Trong khi đó, hàm lượng tro lại rất cao và dao động từ 67,1-86,4%.

Bảng 5: giá trị dinh dưỡng của biofloc (% khối lượng khô) trong thời gian thí nghiệm

Nghiệm thức	Thời gian thu mẫu								
	Ngày 7			Ngày 14			Ngày 21		
	Protein	Lipid	Tro	Protein	Lipid	Tro	Protein	Lipid	Tro
35 ppt	12,2 ^b	0,80 ^a	69,9 ^b	17,4 ^a	1,05 ^a	67,1 ^a	9,3 ^a	0,65 ^b	86,4 ^a
60 ppt	10,5 ^{ab}	0,89 ^a	76,2 ^{ab}	16,4 ^a	0,92 ^a	70,4 ^a	12,4 ^b	1,02 ^a	74,8 ^a
80 ppt	9,8 ^a	0,77 ^a	80,6 ^a	15,6 ^a	1,08 ^a	69,9 ^a	10,4 ^a	0,83 ^{ab}	81,0 ^a
100 ppt	8,5 ^a	0,67 ^a	82,2 ^a	15,9 ^a	0,94 ^a	71,7 ^a	9,6 ^a	0,91 ^a	78,9 ^a

Nhìn chung, giá trị dinh dưỡng của biofloc ở các nghiệm thức có sự chênh lệch. Hàm lượng protein ở các NT 80 và 100 ppt thấp hơn 35 và 60 ppt, tuy nhiên hàm lượng tro thì ngược lại (cao hơn). Kết quả cũng chỉ ra rằng hàm lượng protein ở các NT đều đạt cực đại vào ngày 14, sau đó giảm ở ngày 21 (Bảng 5).

4 THẢO LUẬN

Wilén *et al.* (2000) thấy rằng sự kết dính của floc xảy ra ở nhiệt độ thấp (4°C) kém hơn so với

nhiệt độ cao (18-20°C), có thể là do sự sụt giảm hoạt động của vi sinh vật trong bioflocs. Krishna and Van Loosdrecht (1999) cho rằng nhiệt độ nước trung bình 20-25°C là tốt nhất để bioflocs ổn định vì ở nhiệt độ cao hơn (30-35°C) sẽ dẫn đến hiện tượng bùn khó lắng (SVI ≥ 500 ml/g) do sự sản xuất quá mức của đường đa phân tử ngoại bào. Nhiệt độ 28-30°C được coi là khoảng tối ưu cho sự phát triển của biofloc (Nguyễn Thị Thu Hiền, 2012). Nhiệt độ được theo dõi trong thí nghiệm này dao động trong phạm vi 27-36,6°C. Kết quả này

trương đồng với kết quả Trần Nguyễn Hải Nam (2012) khi theo dõi khả năng phát triển của vi khuẩn dị dưỡng bằng cách bổ sung nguồn carbohydrate từ bột khoai mì cũng cho thấy phạm vi nhiệt độ trong khoảng 24-36°C. Boyd (1998) cho rằng ảnh hưởng của nhiệt độ rất phức tạp, nhiệt độ không chỉ ảnh hưởng trực tiếp lên quá trình trao đổi chất của vi sinh vật mà còn tác động đến hàm lượng oxy hòa tan trong nước.

Hàm lượng oxy hòa tan không chỉ ảnh hưởng đến hoạt động trao đổi chất của các tế bào trong hạt biofloc hiệu quả mà còn tác động đến cấu trúc biofloc (Wilen and Balmer, 1999). Kích thước và độ ổn định của các hạt biofloc có xu hướng được cải thiện khi hàm lượng oxy hòa tan tăng (De Schryver *et al.*, 2008). Một số nghiên cứu trong các hệ thống nuôi với công nghệ biofloc cho thấy hàm lượng oxy hòa tan thích hợp cho đối tượng nuôi và sự phát triển của biofloc thường >3 mg/L (Nyan Taw, 2005; Trần Nguyễn Hải Nam, 2011, Widanarni *et al.*, 2012, Emerenciano *et al.*, 2012). Do đó hàm lượng oxy hòa tan trong thí nghiệm cứu phù hợp với các nghiên cứu trên và không ảnh hưởng đến quá trình hình thành biofloc.

pH là một trong những yếu tố môi trường có sự liên quan lớn nhất tới sự tăng trưởng của vi sinh vật. Vi sinh vật chiếm ưu thế trong phạm vi pH có lợi cho dinh dưỡng, sinh sản và tồn tại Carvalho, 1978). Do đó, thay đổi pH có thể ảnh hưởng đến tính ổn định của biofloc trong ao nuôi (Mikkelsen *et al.*, 1996). Nguyễn Thị Thu Hiền (2011) cho rằng khi pH < 7,1 thì chỉ số FVI (Floc Volume Index) của biofloc <0,5 ml/L và hạt floc trong các bể nuôi có biểu hiện bị phá vỡ các liên kết, hạt floc nhỏ. Giá trị FVI ổn định và tốt nhất khi pH >7,3. Trong một thí nghiệm tương tự gần đây của Trần Nguyễn Hải Nam (2012) cũng cho thấy pH dao động trong khoảng 7,1-8,4 tương tự như kết quả trong thí nghiệm này (7,2-8,3). Madigen *et al.* (2000) cho rằng các loại nấm phát triển tốt trong điều kiện có tính axit, trong khi đó vi khuẩn phát triển trong môi trường kiềm, mặt khác phạm vi pH thích hợp cho sự phát triển của hầu hết các loài tảo (là thành phần của biofloc) là 7-9, tối ưu là 8,2-8,7 (Richmond, 1986). Nhìn chung, các yếu tố môi trường có sự chênh lệch giữa các NT nhưng vẫn nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển của biofloc.

Protein là thành phần chủ yếu tạo nên tế bào vi khuẩn. Tỷ lệ C:N hầu hết vi khuẩn là từ 4-5 (Ebeling and Timmons, 2006). Khi vi khuẩn được cung cấp cơ chất chứa carbon không có hoặc có rất ít nitrogen (như các loại đường, bột, ri đường

protein, bột khoai mì,...) chúng phải lấy nitrogen từ môi trường nước để sản sinh ra protein cần thiết cho sự phát triển và nhân lên của tế bào. Nhiều tác giả (Avnimelech 2007; Samocha *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2008; Crab *et al.*, 2007; Hargreaves, 2013) cho rằng ở tỉ lệ C:N thích hợp, vi khuẩn dị dưỡng cố định nitơ vô cơ trong môi trường để chuyển hoá thành sinh khối của chúng, lượng sinh khối vi khuẩn ở các điều kiện nhất định sẽ gắn kết thành phần khác để tạo thành biofloc. Jana *et al.* (2001) cho rằng tỉ lệ C:N trong khoảng 5-55 giúp cho sự phát triển của hệ vi khuẩn dị dưỡng. Khi nghiên cứu hệ sinh thái nước lợ ven biển, Lancelot and Billen (1985) đã kết luận việc hấp thụ nitơ vô cơ của vi khuẩn chỉ diễn ra khi tỉ lệ C:N của vật chất hữu cơ >10. Và như vậy việc gia tăng tỉ lệ C:N có thể làm tăng lên sức sản xuất của vi khuẩn trong ao nuôi tôm (Burford *et al.*, 2003). Tỉ lệ C:N ≈ 8 – 10 vi khuẩn tự dưỡng chiếm 64,4% và 35,6% là vi khuẩn dị dưỡng. Khi tỉ lệ C:N ≈ 12 – 14 gần như vi khuẩn dị dưỡng chiếm 100% (Ebeling and Timmons, 2006). Tỉ lệ C:N cao hơn 15 được xem là hiệu quả để kiểm soát sự tích tụ của các hợp chất nitrogen cũng như quá trình tái tạo protein. Một số tác giả (ví dụ Tezuka, 1990; Avnimelech, 1999; McIntosh, 2000; Panjaitan, 2010, Widanarni *et al.*, 2012) báo cáo rằng tỉ lệ C:N tương ứng là 15:1 được xem là hiệu quả để loại bỏ ni tơ từ nước. Trong thí nghiệm này việc bổ sung phân gà và bột khoai mì để duy trì tỉ lệ C:N ≥ 10, mặc dù vậy kết quả từ Hình 1 cho thấy tỉ lệ C:N ở các NT trong thời gian thí nghiệm chỉ biến động trong khoảng 5,2-9<10.

Để tạo thành sinh khối thì ngoài việc đồng hoá nitơ, vi khuẩn dị dưỡng còn phải sử dụng trực tiếp nguồn carbon từ môi trường. Hàm lượng TN (Hình 2) và TOC (Hình 3) trong thí nghiệm này (ở phạm vi độ mặn nghiên cứu) duy trì ổn định, có thể là do sự phát triển của vi khuẩn đã sử dụng carbon và nitơ trong môi trường để tạo nên sinh khối của chúng nên hàm lượng tổng carbon và đạm không có xu hướng tăng cao, mặc dù nguồn nguyên liệu vẫn được bổ sung thường xuyên (1 lần/3 ngày). Kết quả cũng chỉ ra rằng hàm lượng TN và TOC ở độ mặn thấp (35 ppt) thấp hơn ở các độ mặn cao (60, 80, 100 ppt). Trong một nghiên cứu của Crab *et al.* (2009) sử dụng thức ăn viên có hàm lượng protein là 30% và 23% được bổ sung và không bổ sung tinh bột bắp để đảm bảo tỉ lệ C:N là 20, kết quả cho thấy TN tăng như nhau ở tất cả các NT (dao động từ 10-32 mgN/L). Đặc biệt ở NT có bổ sung tinh bột để tỉ lệ C:N tăng lên 20 thì toàn bộ

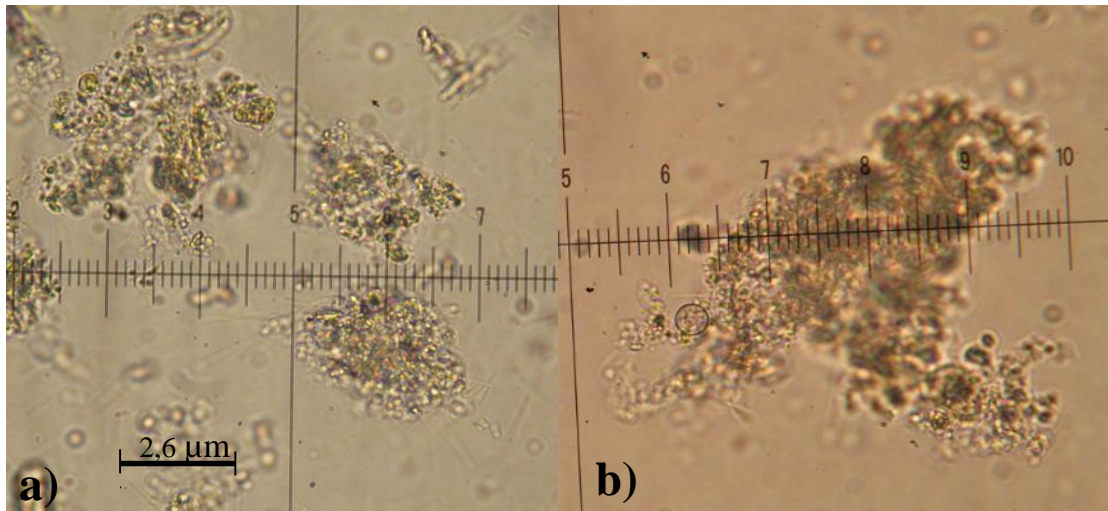
nitrogen thêm vào được chuyển sang dạng nitrogen hữu cơ lơ lửng (nitrogen trong biofloc).

Theo Rittman and McCarty (2001) thì lượng biofloc có thể được ước tính dựa trên hàm lượng TSS và VSS. Hàm lượng VSS được sử dụng như thước đo sinh khối của vi khuẩn (Rittmann and McCarty, 2001; Ebeling *et al.*, 2006). Kết quả thống kê ở Bảng 2 cho thấy hàm lượng TSS và VSS trong thí nghiệm không có sự khác biệt lớn giữa các NT, ở độ mặn 80 và 100 ppt cho thấy không có khác biệt thống kê ($p>0,05$) với 35 và 60 ppt, điều này chỉ ra rằng độ mặn trong phạm vi nghiên cứu không ảnh hưởng đến thông số TSS và VSS. Bên cạnh đó, Kuhn *et al.* (2008) cho rằng bổ sung nguồn carbon đã làm gia tăng tốc độ hình thành của biofloc (vi khuẩn dị dưỡng là thành phần vi sinh chính trong biofloc). Sự phát triển của vi khuẩn dị dưỡng cũng có thể được đánh giá thông qua biofloc. Tương tự như TSS và VSS, tổng vi khuẩn (Hình 4) và thể tích biofloc (Hình 5) cũng cho thấy không có khác biệt lớn giữa các NT và thấp hơn các nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hiền (2011) và Trần Nguyễn Hải Nam (2012). Nguyên nhân có thể do thời gian thí nghiệm quá ngắn (21 ngày) trong khi các nghiên cứu khác là trên 30 ngày, tỉ lệ C:N trong thí nghiệm chỉ dao động trong khoảng 5-9<10, làm chậm quá trình phát triển của vi khuẩn dị dưỡng cũng như sự hình thành biofloc. Ngoài ra cũng có thể do nguồn cấp đầu vào (nguồn nước, phân bón, bột khoai mì,...) khác nhau (có bổ sung N và C), thời gian bón nguyên liệu và thu mẫu khác nhau hoặc do ảnh hưởng thời tiết cũng có thể dẫn đến sự khác biệt này.

Kết quả trong thí nghiệm (TSS, VSS, tổng vi khuẩn, thể tích biofloc) gần như không khác biệt giữa các NT ($p>0,05$). Thành phần chính của biofloc là vi khuẩn và tảo. Trong thí nghiệm, ngoài các chủng vi khuẩn đã được xác định như *Vibrio*, *Bacillus*, *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* thì còn các chủng vi khuẩn khác (Bảng 3) chiếm tỉ lệ rất cao trong các nghiệm thức. Có thể đây là những vi khuẩn ưa mặn. Deng *et al.* (2013), nghiên cứu thành phần vi khuẩn ưa mặn (Halophilic bacteria) trên ruộng muối Trung Quốc cho thấy phần lớn vi khuẩn hoạt động ở nồng độ muối từ 0-250 ppt, nồng độ muối tối ưu là 50 ppt. Phạm vi độ mặn trong thí nghiệm cũng nằm trong khoảng hoạt động của vi khuẩn. Mặt khác, một số nghiên cứu cho thấy độ mặn không có ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng của vi khuẩn, độ mặn tăng lên hoặc hạ xuống sẽ chọn lọc các loài có chức năng sinh lý mới có khả năng chịu đựng các nồng độ muối nhất

định (Del Giorgio and Cole, 1998; Nielsen *et al.*, 2003).

De Schryver *et al.* (2008) cho rằng vi khuẩn có kích thước rất nhỏ (khoảng 1 μm). Tuy nhiên, ở mật độ cao, vi khuẩn có khuynh hướng kết dính với nhau và tạo thành hạt biofloc có đường kính khoảng 0,1 mm đến vài mm. Kích thước của hạt biofloc ở trạng thái ổn định trong các hệ thống biofloc là một chỉ tiêu quan trọng vì trong nuôi trồng thủy sản, kích thước của hạt thức ăn cũng là một trong những tiêu chí thể hiện chất lượng thức ăn (De Schryver *et al.*, 2008). Do vậy, qui trình vận hành công nghệ biofloc có thể được điều chỉnh để cân đối kích thước của hạt biofloc theo yêu cầu của đối tượng nuôi ở từng giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Nếu cường độ khuấy đảo và lưu tốc dòng chảy cao, kích thước trung bình của hạt biofloc sẽ giảm do chúng bị vỡ ra (De Schryver *et al.*, 2008). Biggs and Lant (2000) cho biết khi sử dụng bùn hoạt tính để xử lý nước, với biến thiên lưu tốc trung bình (G) là 19,4/s ($\approx 0,5 \text{ W/m}^3$) thì kích thước trung bình của tế bào là 130 μm . Kích thước tế bào giảm xuống chỉ còn khoảng 20 μm khi biến thiên lưu tốc tăng lên đến 346/s ($\approx 125 \text{ W/m}^3$). Trong thí nghiệm này, bừa trực 2 lần/ngày là phương pháp được sử dụng nhằm khuấy đảo dòng nước để tác động làm vỡ hạt biofloc và làm chúng có kích thước nhỏ hơn để phù hợp cho đối tượng nuôi. Mặt khác, kết quả trong thí nghiệm cho thấy ở độ mặn cao 80 và 100 ppt kích thước hạt biofloc nhỏ hơn độ mặn thấp (35 và 60 ppt) (Bảng 4 và Hình 6). De Schryver *et al.* (2008) cho rằng có nhiều cơ chế kết hợp ảnh hưởng đến sự hình thành, hình dạng và sự bền vững của biofloc. Nhiều sinh vật có khả năng tạo các hợp chất cao phân tử ngoại bào (từ các polysaccharide, protein, hợp chất mùn...). Các hợp chất này được xem như chất keo gắn kết tế bào và các phân tử khác lại với nhau. Ngoài ra còn một cơ chế kết dính khác là sự cân bằng giữa lực hút ở khoảng cách ngắn (tương tác phân tử, lưỡng cực, liên kết hydrogen) và lực đẩy tĩnh điện. Hiện nay vẫn rất ít tài liệu nghiên cứu về khả năng kết dính hạt biofloc ở độ mặn khác nhau mặc dù hầu hết sinh vật mang điện tích âm và tạo ra lực đẩy tĩnh điện, khi độ mặn cao (lực ion cao) hoặc ion đa hóa trị chiếm ưu thế, việc bổ sung Ca^{2+} hoặc Al^{3+} tạo nên sự kết dính bền vững (De Schryver *et al.*, 2008). Do đó có thể khi ở độ mặn cao thì sự kết dính kém bền, dễ bị phá vỡ nên kích thước hạt biofloc ở độ mặn cao nhỏ hơn. Ngoài ra, ở độ mặn cao vi khuẩn phát triển chậm hơn ở độ mặn thấp (cùng thời điểm) dẫn đến kích thước cũng khác nhau.



Hình 6: Hình dạng và kích thước của biofloc ở độ mặn 100 ppt (a) và 60 ppt (b) ở ngày 21

Kết quả phân tích dinh dưỡng của biofloc cho thấy không có sự khác biệt lớn ở các độ mặn khác nhau. Hàm lượng protein trong hạt biofloc ở các NT rất thấp (8,5-17,4% khối lượng khô), trong khi các nghiên cứu trước đây (McIntosh *et al.*, 2000; Tacon *et al.*, 2002; Soares, 2004; Wasielesky *et al.*, 2006; Ju *et al.*, 2008, Kuhn *et al.*, 2009; Maica *et al.*, 2011; Emerenciano *et al.*, 2012) thì hàm lượng protein khá cao (12-49% khối lượng khô). Ngược lại, hàm lượng tro trong thí nghiệm lại rất cao chiếm 67,1-86,4% so với các kết quả khác là 13-46%. McIntosh (2000) và Tacon (2002) đều xác định hàm lượng tro của hạt biofloc ở mức cao nhưng trung bình cũng chỉ từ 26,0 và 30,2%. Thành phần dinh dưỡng của biofloc khác biệt tùy thuộc vào điều kiện môi trường, nguồn carbon sử dụng, hàm lượng TSS, độ mặn, mật độ nuôi, cường độ chiếu sáng, quần xã thực vật phù du và vi khuẩn... (Kuhn and Lawrence, 2012). De Schryver *et al.* (2008) cũng cho rằng thành phần dinh dưỡng của biofloc có sự khác biệt đáng kể khi nguồn carbon bổ sung khác nhau. Việc bổ sung các nguồn carbon khác nhau (như glucose, tinh bột, glycerol hoặc acetate) đã tạo ra những khác biệt đáng kể về hàm lượng của các nhóm acid béo (Crab *et al.*, 2010). Ngoài ra, trong biofloc còn có tảo, nấm và một lượng đáng kể các sinh vật sử dụng chúng làm thức ăn như động vật nguyên sinh hoặc động vật phù du. Sự hiện diện của những tác nhân này có thể ảnh hưởng đến tỉ lệ phần trăm của hàm lượng dinh dưỡng trong biofloc. Nhìn chung, ảnh hưởng của độ mặn lên sự hình thành và phát triển của biofloc trong thí nghiệm này vẫn chưa rõ ràng. Mặc dù Timmons *et al.* (2002) lưu ý rằng pH, độ kiềm, nhiệt độ, oxy, amoniac, và độ mặn cũng ảnh hưởng

đến sự phát triển của vi khuẩn dị dưỡng, tuy nhiên các tài liệu nghiên cứu có liên quan rất hạn chế để có thể so sánh cụ thể trong thí nghiệm này.

5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1 Kết Luận

- Tỉ lệ C:N giảm nhanh ở độ mặn 35 và 60 ppt trong 3 ngày đầu, các độ mặn cao hơn thì tỉ lệ C:N ổn định trong mức từ 5-9; sau 2 tuần tỉ lệ C:N giảm khi độ mặn tăng lên.

- Các thông số đánh giá chất lượng biofloc TSS, VSS, tổng vi khuẩn và thể tích biofloc cho thấy: hàm lượng TSS và VSS tăng dần theo thời gian nuôi. Tương tự, tổng vi khuẩn cũng tăng dần và đạt cao nhất vào ngày 15. Thể tích biofloc giảm dần theo độ mặn.

- Vi khuẩn vibrio chiếm tỉ lệ rất thấp và ở độ mặn cao (100 ppt) không phát hiện nhóm vi khuẩn này.

- Tỉ lệ vi khuẩn khác chưa được định danh ở độ mặn ≥ 60 ppt chiếm rất cao.

- Kích thước hạt biofloc ở các độ mặn 35 và 60 ppt lớn hơn ở độ mặn 80 và 100 ppt.

- Hàm lượng protein tương đối thấp (ở độ mặn cao hàm lượng protein thấp hơn). Trong khi đó, hàm lượng tro lại rất cao.

5.2 Đề xuất

- Kéo dài thời gian thí nghiệm và gia tăng tỉ lệ C:N để vi khuẩn dị dưỡng phát triển tốt hơn.

- Có thể ứng dụng công nghệ biofloc cho đối tượng nuôi *Artemia* ở độ mặn thích hợp dựa vào kích thước hạt flocc (80-100 ppt).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176:227-235.
2. Avnimelech, Y. 2006. Bio-filters: the need for an new comprehensive approach. *Aquac. Eng.* 34 (3), 172–178.
3. Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140-147.
4. Boyd, C.E., 1998. Pond water aeration systems. *Aquac. Eng.* 18 (1), 9–40.
5. Burford, M. A., Thompson, P.J., McIntosh R. P., Bauman R. H., Pearson D. C. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219: 393–411.
6. Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. 2007. Nitrogen removal in aquaculture towards sustainable production. *Aquaculture* 270 (1–4), 1–14.
7. Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W., Avnimelech, Y. 2009. Bioflocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquac Eng* 40:105-112.
8. Chamberlain, G., Avnimelech, Y., McIntosh, R.P., Velaso M. 2001. advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N. I. Nutrient transformation and water quality benefits. *Global aquaculture advocate* 4: 53-6
9. De Schryver, P. 2010. Poly- β -hydroxybutyrate as a microbial agent in aquaculture. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
10. De Schryver, P., Crab, R., Defroit, T., Boon, N. and Verstraete, W. 2008. The basic of bioflocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125-137.
11. Del Giorgio, P., Cole, J.J. 1998. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annu Rev Ecol Sys* 29:503-541.
12. Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257: 346–358
13. Emerenciano, M., Ballester, E.L.C, Cavalli, R. and Wasielesky, W. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research* 43: 447–457.
14. Hargreaves, J.A. 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. 11p.
15. Hargreaves, JA. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquac Eng* 34:344-363.
16. Jana, B. B., Chakraborty, P., Biswas, J. K., Ganguly, S. 2001. Biogeochemical cycling bacteria as indices of pond fertilization: importance of C:N/P ratios of input fertilizers. *Journal of Applied Microbiology* 90: 733-740.
17. Jorand, F, Zartaria, F, Thomas, F, Block J.C, Bottero, J.Y, Villemin G, Urbain V, Manem J. 1995. Chemical and structural (2d) linkage between bacteria within activated-sludge flocs. *Water Res* 29:1639-1647.
18. Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W.C., Horgen, F.D. 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research*, 39, 118–133.
19. Kent, M., Browdy C.L., Leffler, J.W. 2011. Consumption and digestion of suspended microbes by juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 319: 363-368.
20. Krishna, C., Van Loosdrecht, M.C.M., 1999. Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. *Water Res.* 33 (10), 2374–2382.
21. Kuhn, D.D., Boardman, G., Lawrence, A., Marsh, L., Flick, G. 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture*, 296, 51–57.
22. Kuhn, D.D, Lawrence, A. 2012. Ex-situ biofloc technology. In: Avnimelech Y, editor. Biofloc Technology - a practical guide book, 2nd ed., The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. pp. 217-230
23. Kuhn, D.D., Boardman, G.D., Craig, S.R., Flick, Jr.G.J., McLean, E. 2008. Use of microbial flocs generated from tilapia effluent as a nutritional supplement for shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in

- recirculating aquaculture systems. *J World Aquacult Soc* 39:72-82.
24. Lancelot, C., Billen, G. 1985. Carbon–nitrogen relationships in nutrient metabolism of coastal aquatic ecosystems. In: Jannasch, H.W., Williams, J. J. L. (Eds.), *Advances in Aquatic Microbiology* vol.3. Academic Press, New York, USA, pp. 263–3210.
 25. Maicá, P.F., Borba, M.R., Wasielesky, W. 2011. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. *Aquaculture Research* (online published first–DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02838.x).
 26. McIntosh, R.P. 2000. Changing paradigms in shrimp farming: III. Pond design and operation considerations. *Global Aquaculture Advocate*, 3:42-44.
 27. Metcalf and Eddy, 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th edition.
 28. Nielsen, D.L., Brock, M.A., Rees, G.N., Baldwin, D.S. 2003. Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Aus J Bot* 51:655-665.
 29. Nguyễn Thị Thu Hiền. 2012. Bản tin Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, Số 8 (2012 - 1/2013): 13-15.
 30. Panjaitan, P. 2011. Effect of C:N Ratio Levels on Water Quality and Shrimp Production Parameters in *Penaeus monodon* Shrimp Culture with Limited Water Exchange Using Molasses as a Carbon Source. *ILMU KELAUTAN* Maret 2011. Vol. 16 (1) 1-8.
 31. Panjaitan, P. 2010. The *Penaeus monodon* shrimp culture with zero water exchange model using molasses as carbon source. The Study Centre of Anima; Husbandry, Fisheries, Coastal and Marine Resource, Animal Husbandry Faculty, University of HKBP Nommensen, Medan Indonesia.
 32. Rittmann, B.E., McCarty, P.L. 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill, New York. 754 pp.
 33. Ronald Lulijwa 2010. Effect of nutrient supplementation on *Artemia* production in solar salt ponds in the Mekong Delta, Vietnam. MSc thesis, Gent University.
 34. Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M, Burger, J.M, Almeida, R.V, Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A., Brock, D.L. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Eng* 36:184-191.
 35. Soares, R., Jackson, C., Coman, F., Preston, N. 2004. Nutritional composition of flocculated material in experimental zero-exchange system for *Penaeus monodon*. In: *Australian Aquaculture, 2004 WAS*, Sydney p.89.
 36. Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O.E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8, 121–137.
 37. Taw, N. 2005. Shrimp Farming in Indonesia, evolving industry responds to varied issues. *Global aquaculture advocate*, 8(4), 65-67.
 38. Tezuka, Y. 1990. Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the Carbon: Nitrogen: Phosphorus ratio of organic substrates. *Microbial Ecology*, 19: 227–238.
 39. Timmons, M.B., Ebeling, H.J., Wheaton, F.W., Summerfelt, S.T., Vinvi, B.J. 2002. *Recirculating aquaculture systems*, 2nd edition. NRAC Publication, vol. 01-002. 2d Edition. 768 pp.
 40. Trần Nguyễn Hải Nam, 2012. Ảnh hưởng của tỉ lệ C:N trong nguồn thức ăn bổ sung lên sự phát triển của vi khuẩn dị dưỡng, sản lượng và chất lượng trứng bào xác trong ao nuôi *Artemia*. Đề tài cấp bộ. 82 trang.
 41. Wasielesky, W.Jr, Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258, 396–403.
 42. Widanarni, Ekasari, J., Maryam, S. 2012. Evaluation of Biofloc Technology Application on Water Quality and Production Performance of Red Tilapia *Oreochromis* sp. Cultured at Different Stocking Densities. *HAYATI Journal of Biosciences* 19 (2): 73-80.
 43. Wilen, B.M., Nielsen, J.L., Keiding, K., Nielsen, P.H., 2000. Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloid Surf. B*. 18 (2): 145–156.