

NGHIÊN CỨU SỰ TẠO KHỐI BIOFLOC CỦA VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* VÀ *CHLORELLA VULGARIS*

STUDY OF BIOFLOC FORMATION OF *ESCHERICHIA COLI* AND *CHLORELLA VULGARIS*

Trần Thị Ngọc Thu^{1*}, Nguyễn Thị Đông Phương¹, Nguyễn Phan Trúc Xuyên²

¹Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật - Đại học Đà Nẵng

²Trường Đại học Duy Tân

*Tác giả liên hệ: ttntthu@ute.udn.vn

(Nhận bài: 22/12/2021; Chấp nhận đăng: 10/5/2022)

Tóm tắt - Nghiên cứu này đã đưa ra những kết quả đầu tiên về sự có mặt của vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) trong môi trường nuôi vi tảo Bold's Basal medium (BBM) và hình thành các khối biofloc với vi tảo. Với sự có mặt của vi khuẩn *E. coli* ATCC 85922, hiệu suất hình thành biofloc hay là hiệu quả loại thải các hạt lơ lửng trong môi trường đạt tới hơn 98% sau ngày thứ 05 (là ngày tính từ việc thả vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy tảo). Kết quả chụp từ kính hiển vi điện tử quét (SEM) cũng cho thấy, sự bao bọc của *E. coli* và vi tảo tạo thành một khối. Ngoài ra, khi quan sát bằng mắt thường các khối bông được hình thành và lắng xuống dưới đáy bình nuôi cấy. Quan sát bằng kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 400 lần, kết quả cũng cho thấy các tế bào vi tảo kết dính lại với nhau thành từng khối có kích thước 150 đến 220 μm .

Từ khóa - Biofloc; công nghệ biofloc; vi tảo; vi khuẩn; sự kết dính

1. Đặt vấn đề

Biofloc là một tập hợp không đồng nhất các hạt lơ lửng và nhiều loại vi sinh vật liên kết với các chất cao phân tử ngoại bào. Biofloc bao gồm vi khuẩn, tảo, động vật nguyên sinh, các mảnh vỡ của các phân tử hữu cơ và các sinh vật khác, là nguồn thức ăn giàu protein được hình thành do quá trình chuyển hóa thức ăn không sử dụng và phân thành thức ăn tự nhiên trong hệ thống nuôi khi tiếp xúc với ánh sáng mặt trời. Mỗi biofloc được kết dính với nhau trong một ma trận lỏng lẻo của chất nhầy do vi khuẩn tiết ra và được liên kết bởi các vi sinh vật dạng sợi hoặc lực hút tĩnh điện. Có thể nhìn thấy các bông lớn bằng mắt thường, nhưng hầu hết chúng đều ở dạng siêu nhỏ. Ngày nay, nhiều nơi trên thế giới đã ứng dụng công nghệ biofloc vào nhiều lĩnh vực như xử lý nước thải, thu hoạch vi tảo, đặc biệt là làm thức ăn nuôi tôm cá như là một nguồn cung cấp protein thực vật [1], [2], [3].

Công nghệ biofloc có ảnh hưởng sâu sắc đến việc áp dụng sản xuất nuôi trồng thủy sản quy mô lớn. Tổng cộng một nửa sản lượng nuôi trồng thủy hải sản là từ cá, tiếp theo là các động vật thân mềm 2 mảnh (trai, nghêu, sò) chiếm ¼ sản lượng, và phần còn lại là rong biển và tảo. Năm 2007, cá nước ngọt đã bổ sung thêm 43% lượng thức ăn động vật biển cho con người tiêu thụ [4]. Với việc tăng năng suất khai thác động vật biển ngày càng cao, việc cung cấp thức ăn cho các nông trại nuôi trồng hải sản cũng đòi hỏi sản xuất với quy mô rất lớn. Trong khi đó, việc kiểm soát thức ăn công nghiệp nuôi tôm cá đòi hỏi

Abstract - This study demonstrated the first results on the presence of *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria in Bold's Basal medium (BBM) and the formation of biofloc with microalgae. With the presence of *E. coli* ATCC 85922, the biofloc formation efficiency or the removal efficiency of suspended particles in the environment reached more than 98% after the fifth day (accounted from the time that bacteria were added in microalgae cultivation). Scanning electron microscopy results (SEM) also showed the enveloping of *E. coli* and microalgae forming a floc. In addition, when observed with the naked eye, clumps of floc were formed and settled to the bottom of the culture flask. Observed by electron microscopy at 400 magnifications, the results also proved that the microalgae cells stucked together into blocks of 150 to 220 μm in size.

Key words - Biofloc; biofloc technology; microalgae; bacteria; aggregation

nghiêm ngặt sử dụng liều lượng kháng sinh dưới mức cho phép của tiêu chuẩn quốc tế khi xuất khẩu. Do đó, các nghiên cứu trong thời gian gần đây đã tập trung vào việc phát triển các chiến lược thay thế thức ăn bằng nguồn cung cấp tối thiểu bột cá và dầu cá, sau đó được thay thế bằng các nguồn protein thay thế và rẻ hơn như protein thực vật [5], [6].

Vi khuẩn có vai trò rất lớn trong cơ chế hình thành các biofloc, nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, với sự tạo màng nhầy hay là các cao phân tử ngoại bào của vi khuẩn, vi khuẩn có thể gắn kết các tế bào, các phân tử lơ lửng trong các lớp này. Các quần xã vi sinh vật được hình thành trong các lớp màng nhầy này bao gồm thực vật phù du, vi khuẩn và tập hợp các chất hữu cơ dạng hạt sống và chết. *Escherichia coli* (*E. coli*) là vi khuẩn Gram âm thường có trong các ao, hồ, và đầm nuôi thủy hải sản cùng với các loài khác thuộc chi *Bacillus*, *Proteobacterium*, và *Actinobacterium* [7], [8].

Vì vậy, trong bài báo này, nhóm tác giả nghiên cứu sự tạo thành các khối biofloc của *E. coli* ATCC 85922 với vi tảo *C. vulgaris* trong môi trường nuôi cấy của vi tảo. Nghiên cứu nhằm hướng đến việc tăng hiệu suất thu hồi các tế bào lơ lửng khó lắng của vi tảo mà không cần dùng các phương pháp phân tách vật lý khác như lắng, lọc, ly tâm. Ngoài ra, còn nhằm hướng tới sự tạo thành biofloc của vi khuẩn và vi tảo, một nguồn protein thực vật dồi dào có trong bể nuôi tôm cá, nhằm tạo nguồn thức ăn mới cho các bể nuôi này.

¹ The University of Danang – University of Technology and Education (Thi Ngọc Thu Tran, Thi Dong Phuong Nguyen)

² Duy Tan University (Truc Xuyen Nguyen Phan)

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

E. coli ATCC 85922 được thu thập từ phòng vi sinh thuộc Viện Công nghệ Sinh học, thành phố Huế. Giống vi khuẩn này được nuôi tăng sinh trong môi trường trypton soya broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) với thành phần dinh dưỡng như sau: 17,0 g/L tryptone; 3,0 g/L đậu nành chứa papain tiêu hoá; 5 g/L NaCl; 2,5 g/L Dextrose; 2,5 g/L K_2HPO_4 [9].

Chlorella vulgaris SAG 211-19 (SAG, Germany) được nuôi trong môi trường BBM có hiệu chỉnh với thành phần dinh dưỡng theo Bảng 1 [10], [11].

Bảng 1. Thành phần môi trường dinh dưỡng BBM

Thành phần	Hàm lượng (mg/L)	Thành phần	Hàm lượng (mg/L)
H_3BO_3	11,42	$Na_2EDTA.2H_2O$	63,61
$MgCl_2.4H_2O$	1,44	NaCl	25,00
$CaCl_2$	18,87	$Fe_2(SO_4)_3.7H_2O$	4,98
KOH	31,00	$Na_2MoO_4.2H_2O$	1,19
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,49	$MgSO_4$	36,63
K_2HPO_4	75,00	$NaNO_3$	250,00
$CuSO_4.5H_2O$	1,57	$ZnSO_4.7H_2O$	8,82
KH_2PO_4	175,00	-	-

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy vật liệu ban đầu

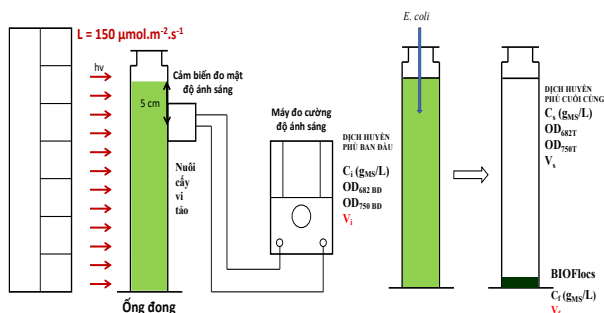
Giống *E. coli* ATCC 85922 được nuôi trong môi trường TSB cho tới khi đạt giá trị mật độ quang tại bước sóng 600nm (OD_{600}) là 0,8 ở nhiệt độ 35 ± 2 °C, tương đương với mật độ tế bào là $(1,05 \pm 0,04) \times 10^8$ CFU/mL.

C. vulgaris SAG 211-19 được nuôi trong môi trường Bold's Basal medium (BBM) với nồng độ ban đầu là 0,1 g/L Tiến hành theo dõi giá trị mật độ quang học của môi trường tại bước sóng 682 nm (OD_{682}) đến khi không đổi, sinh khối tế bào thu được là $0,8 \pm 0,25$ g/L trong bình tam giác 250 mL ở nhiệt độ phòng 25 ± 2 °C, với mật độ ánh sáng trắng là $150 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ [12].

Các giá trị mật độ quang của các mẫu phân tích được xác định trên máy đo quang phổ UV-Vis (Labomed, Mỹ).

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Quá trình bố trí thí nghiệm có thể khái quát ở Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ thí nghiệm nghiên cứu sự hình thành biofloc

C. vulgaris được cho vào các ống đứng 500ml chứa 400 mL thể tích môi trường BBM với nồng độ ban đầu là 0,1 g/L, quá trình nuôi cấy được thực hiện như đã mô tả trong mục 2.2.1 cho tới khi giá trị mật độ quang ở bước sóng 682

nm có giá trị không đổi theo Mục 2.2.3. *E. coli* được thêm vào các ống đứng nuôi cấy này với nồng độ tế bào ban đầu là 10^8 CFU/mL và chuyển qua các ống đứng để dễ quan sát quá trình tạo biofloc. Quá trình tạo thành biofloc được quan sát hình thái bằng kính hiển vi quang học có độ phóng đại 400 lần và hiệu quả keo tụ KT (%) cho tới khi tất cả tế bào vi tảo kết tụ và lắng hết dưới đáy ống đứng.

Tiến hành xác định mức độ kết tụ của các huyền phù lơ lửng trong môi trường nuôi cấy, theo Mục 2.2.3. Các quá trình thí nghiệm đều được bố trí mẫu đối chứng để so sánh kết quả. Mẫu đối chứng là mẫu vi tảo được nuôi ở cùng điều kiện nhưng không cho bất kì giống vi khuẩn nào vào trong môi trường.

2.2.3. Phương pháp xác định hiệu quả keo tụ

Để xác định mật độ vi khuẩn, phương pháp đếm khuẩn lạc được sử dụng theo Hiệp hội sức khỏe cộng đồng Hoa Kỳ [13]. Mật độ quang đo ở bước sóng 682 nm được thực hiện dựa theo các phương pháp đo lường tế bào vi tảo của Hadj-Romdhane và cộng sự đã công bố năm 2012 [12]. Vì thế, hiệu quả kết tụ các hạt huyền phù lơ lửng (KT) trong môi trường nuôi cấy được đánh giá dựa vào công thức như sau:

$$KT, \% = \left(1 - \frac{OD_{682t}}{OD_{682BB}} \right) \times 100$$

Trong đó, OD_{682t} là giá trị mật độ quang của mẫu phân tích được đo ở thời điểm khảo sát; OD_{682BB} là giá trị mật độ quang của mẫu phân tích được đo ở thời điểm bắt đầu thêm vi khuẩn *E. coli* vào.

2.2.4. Phương pháp xác định đặc điểm hình thái và đánh giá quá trình tạo khối biofloc

Vào thời điểm cuối cùng của quá trình tạo biofloc, khi giá trị mật độ quang của các mẫu nước môi trường nuôi cấy được lấy để đo cho giá trị không đổi thì các biofloc được thu hoạch để tiến hành phân tích bằng kính hiển vi quang học (Olympus, Nhật Bản) ở độ phóng đại 400.

Xác định nồng độ sinh khối của các mẫu phân tích theo phương pháp đã được mô tả trong nghiên cứu của Nguyen và cộng sự [14]. Phương trình tương quan giữa mật độ quang tại bước sóng 682nm và nồng độ g/L của vi tảo được tra cứu theo các nghiên cứu trước đã được công bố của nhóm tác giả [15].

Tiến hành chụp SEM các mẫu phân tích theo mô tả trong nghiên cứu của Nguyen và cộng sự công bố năm 2018 [16].

2.2.5. Xử lý số liệu

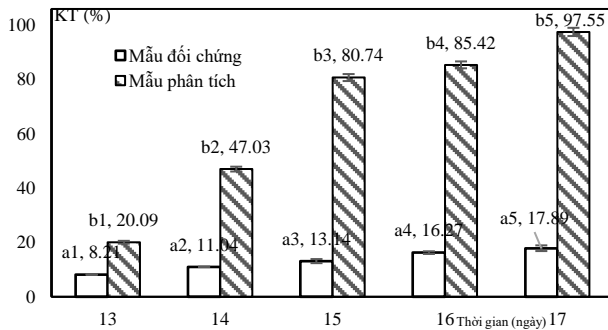
Các mẫu phân tích được lặp lại tối thiểu 03 lần. Kết quả các thí nghiệm được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SD. Dữ liệu được phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm tra sự khác nhau có nghĩa theo Fisher sử dụng phần mềm Minitab ver 18 (với mức ý nghĩa $\alpha=0,05$).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết bông tạo biofloc

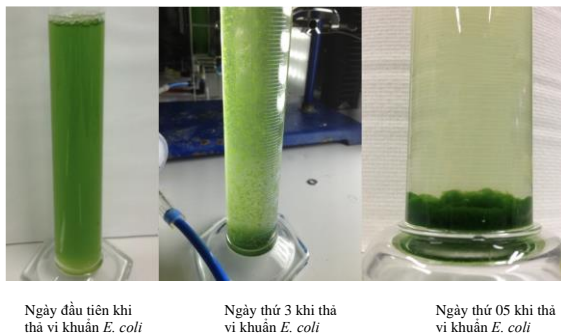
Vi tảo sau khi được nuôi cấy ổn định đến ngày thứ 13 thì giá trị OD_{682} có giá trị thấp hơn giá trị tăng sinh tế bào vi tảo thì được cho thêm các tế bào vi khuẩn *E. coli* ATCC 85922. Bắt đầu từ thời điểm này, các mẫu môi trường nuôi cấy vẫn tiếp tục đo đạt mật độ quang ở 682 nm để tính hiệu quả kết tụ hoặc loại thải các hạt vi tảo huyền phù KT.

Kết quả ở đồ thị Hình 2 cho thấy, hệ số KT (%) tăng mạnh ngay sau ngày thứ 2 (là ngày 14 của quá trình nuôi cấy tảo) của việc thêm vi khuẩn *E. coli* vào môi trường nuôi cấy vi tảo.



Hình 2. Hiệu suất tạo biofloc của *E. coli* ATCC 85922

Tương tự, kết quả từ đồ thị Hình 2 cũng cho thấy, hiệu quả thu hoạch vi tảo khi có mặt vi khuẩn sau 03 ngày phát triển (là ngày 15 của quá trình nuôi cấy tảo) lớn hơn 80%. Và đến ngày 17 của quá trình nuôi vi tảo, với sự có mặt của vi khuẩn *E. coli* thì hệ số KT tính được ở giá trị 98% trong khi mẫu đối chứng chỉ cho giá trị nhỏ hơn 20%. Với kết quả này có thể kết luận rằng, với sự có mặt của vi khuẩn *E. coli*, vi tảo có khả năng kết khối với nhau và dễ dàng lắng xuống đáy của bình nuôi cấy. Theo công bố của Holanda và cộng sự vào năm 2021, với công nghệ biofloc nghiên cứu trên đối tượng là tảo *Arthrospira platensis* trong hệ thống nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*), sau 12 ngày nuôi vi tảo giống này trong hệ thống nuôi tôm, nồng độ vi tảo trong các khối biofloc đạt được là $0,5 \pm 0,59$ g/L, đã loại được hơn 90% phosphate trong hệ thống nước thải [17].



Hình 3. Quá trình tạo biofloc quan sát bằng mắt thường

Hình 3 minh họa cho quá trình kết bông tạo biofloc trong các ống đong từ ngày đầu tiên thả *E. coli* và 5 ngày sau đó. Có thể thấy, biofloc được hình thành sau khi thêm giống vi khuẩn vào trong môi trường nuôi cấy vi tảo sau ngày thứ 3 (là ngày 15 của vi tảo nuôi trong ống đong). So với mẫu đối chứng sau ngày 13 (là ngày đầu tiên thêm vi khuẩn vào mẫu phân tích) trở đi, vi tảo rơi vào pha chết, nhưng khả năng lắng xuống dưới đáy của các tế bào vi tảo cũng rất khó khăn hơn với mẫu thêm vi khuẩn.

3.2. Phân tích hình thái biofloc và ảnh hưởng của quá trình tạo biofloc đến hiệu suất thu hồi vi tảo

3.2.1. Phân tích hình thái biofloc bằng kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét (SEM)

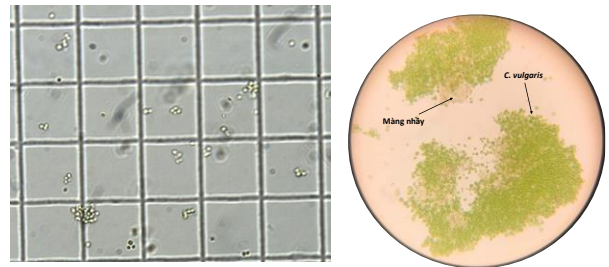
Sau khi các biofloc lắng xuống dưới đáy của các ống đong thủy tinh, môi trường được gạn tách để thu hồi các biofloc. Quá trình phân tích biofloc bước đầu được phân tích

bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 và trên kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscopy -SEM).

Kết quả hình ảnh chụp khối biofloc và mẫu vi tảo đối chứng từ kính hiển vi quang học có độ phóng đại 400 được thể hiện ở Hình 4. Kết quả Hình 4A cho thấy, các tế bào vi tảo nuôi trong môi trường BBM khi không có mặt vi khuẩn được trải lên phiến kính Malassez, các tế bào này riêng lẻ trong môi trường nuôi cấy. Trong khi đó, Hình 4B là ảnh chụp của khối biofloc giữa các tế bào vi tảo và *E. coli*, cho thấy các tế bào vi tảo kết dính lại với nhau trong môi trường BBM, với sự các lớp màng nhầy đã liên kết các tế bào vi tảo tự do trong môi trường thành một khối biofloc.

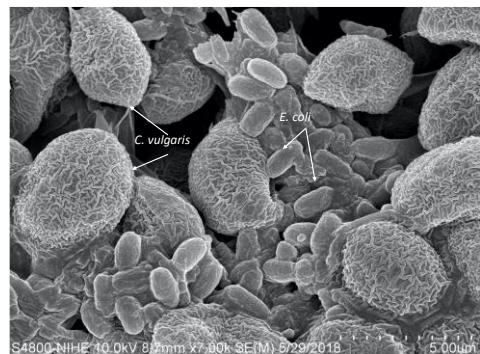
(A)

(B)



Hình 4. (A) Hình ảnh của vi tảo trong môi trường BBM không có vi khuẩn trên phiến kính Malassez; (B) Hình ảnh của các khối biofloc được quan sát dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 400

Để thấy rõ hơn vai trò mối liên kết giữa *E. coli* và vi tảo, khối biofloc được chụp SEM thể hiện ở Hình 5. Kết quả ảnh chụp SEM cho thấy, sự gắn kết của *E. coli* với vi tảo tạo thành khối kết dính. Kết quả cũng cho thấy, rất phù hợp với các nghiên cứu đã đưa ra từ trước tới nay khi nói về cơ chế hình thành biofloc hoặc tạo màng sinh học của vi khuẩn với vi tảo và chất mùn.



Hình 5. Hình ảnh khối biofloc dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Kết quả trên hai Hình 4 và 5, phù hợp với các kết luận đã được chứng minh trong các nghiên cứu trước đây về việc tạo thành biofloc của vi tảo với nhiều loại vi khuẩn khác nhau như nghiên cứu của Fatimah và cộng sự năm 2019 đã thể hiện vai trò của các vi sinh vật, động vật nguyên sinh trong các hồ nuôi tôm làm tăng sự gắn kết các huyền phù lơ lửng có trong hồ và tạo các biofloc [18], [19].

3.2.2. Ảnh hưởng của quá trình tạo biofloc đến hiệu suất thu hồi vi tảo

Tiếp tục phân tích các đặc tính của mẫu vi tảo có bổ sung *E. coli* và mẫu đối chứng không bổ sung *E. coli*, thu được kết quả ở Bảng 2.

Về sự thay đổi kích thước khối biofloc, kết quả cho thấy các khối biofloc đã đạt được kích thước nằm chủ yếu từ

150-220 μm , trung bình đạt khoảng $220,08 \pm 7,47 \mu\text{m}$, tăng lên hơn 40 lần so với kích thước của tế bào vi tảo (5-10 μm). Tương tự, các kết quả nghiên cứu của Pacheco-Vega và cộng sự khi tiến hành thí nghiệm trên các loài *Schizochytrium sp.* và *Lactobacillus platarum* theo công nghệ biofloc đã làm thay đổi chất lượng nước của hồ nuôi tôm chân trắng *L. vannamei* [20].

Bảng 2. So sánh hiệu quả thu hồi vi tảo giữa mẫu phân tích và mẫu đối chứng

Chỉ tiêu	Vi tảo của mẫu đối chứng	Vi tảo của mẫu phân tích
Kích thước biofloc (μm)	$5,12 \pm 1,19$	$220,08 \pm 7,47$
Hiệu suất keo tụ (%)	$18,03 \pm 0,72$	$97,52 \pm 1,98$
Nồng độ sinh khối khô (g/L)	$0,81 \pm 0,04$	$19,05 \pm 0,76$

Với kích thước khối biofloc tăng lên cũng sẽ làm tăng khả năng keo tụ, tỉ lệ keo tụ đạt được gần 100%, trong khi mẫu đối chứng chỉ đạt được 18,03%. Tương tự, nồng độ sinh khối khô thu được từ dung dịch huyền phù của mẫu phân tích đã tăng lên $19,05 \pm 0,76$ (g/L), xấp xỉ gấp 25 lần so với mẫu đối chứng.

Do đó, với đề xuất tận dụng các chất hữu cơ dạng hạt và các vi sinh vật khác trong lưới thức ăn, sự tạo thành các biofloc đã được áp dụng làm nguồn thức ăn tiềm năng cho thủy hải sản [18].

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự tạo thành biofloc của *E. coli* và vi tảo *C. vulgaris* trong môi trường BBM đã thu hồi được hầu hết các tế bào huyền phù lơ lửng trong môi trường lỏng. Việc kết lắng các tế bào vi tảo nhờ sự có mặt của vi khuẩn không những đem lại những thuận lợi trong quá trình xử lý nước, thu hoạch vi tảo mà còn làm thức ăn cho động vật biển. Các kết quả quan sát bằng mắt thường, hay chụp dưới kính hiển vi điện tử, và chụp SEM cũng chứng minh được các khối biofloc được tạo thành.

Với hệ vi sinh vật đa dạng trong hồ nuôi tôm cá, đặc biệt là sự có mặt của vi khuẩn *E. coli* trong các hồ nuôi tôm, nghiên cứu này giả định sự ảnh hưởng của vi sinh vật tới quá trình tạo thành biofloc. Nghiên cứu cũng đã chứng minh vai trò của vi khuẩn tới quá trình kết khối vi tảo tạo các biofloc. Với những hạn chế như sự đa dạng của loài vi sinh vật trong môi trường nuôi vi tảo, các phân tích về đặc tính của các khối biofloc, các tác giả đề xuất nghiên cứu tiếp theo để có thể cho ra những kết quả được xuất bản trong các bài báo tiếp theo.

Lời cảm ơn: Các tác giả gửi lời cảm ơn đến các đồng nghiệp tại Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng đã hỗ trợ trong quá trình tiến hành các thí nghiệm trong nghiên cứu này. Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng trong đề tài có mã số B2019-DN06-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] R. Crab, T. Defoirdt, P. Bossier, and W. Verstraete, "Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges", *Aquaculture*, vol. 356–357, pp. 351–356, 2012.

[2] Vũ Thị Ngọc Nhung, Nguyễn Thị Loan, and Tăng Minh Trí, "Nghiên cứu một số nguồn carbohydrate tạo biofloc để nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)", *Tạp chí Khoa học*, vol. 14,

no. 12, pp. 149–160, 2017.

[3] G. Lara, D. Krummenauer, P. C. Abreu, L. H. Poersch, and W. Wasielesky, "The use of different aerators on *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system: effects on water quality, shrimp growth and biofloc composition", *Aquac. Int.*, vol. 25, no. 1, pp. 147–162, 2017.

[4] A. Vyas, "Biofloc systems in aquaculture: Global status and trends", in *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: trends of microbial biotechnology for sustainable agriculture and biomedicine systems: perspectives for human health*, no. May, A. A. Rastegari, A. N. Yadav, and N. Yadav, Eds. Susan Dennis, 2020, pp. 31–42.

[5] J. A. Pérez-Fuentes, M. P. Hernández-Vergara, C. I. Pérez-Rostro, and I. Fogel, "C:N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation", *Aquaculture*, vol. 452, pp. 247–251, 2016.

[6] K. R. Da Silva, W. Wasielesky, and P. C. Abreu, "Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*", *J. World Aquac. Soc.*, vol. 44, No. 1, pp. 30–41, 2013.

[7] P. Zhao *et al.*, "The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*", *Aquaculture*, vol. 354–355, pp. 97–106, 2012.

[8] W. J. Xu, T. C. Morris, and T. M. Samocha, "Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system", *Aquaculture*, vol. 453, pp. 169–175, 2016.

[9] Nguyễn Thị Kiều Diễm, Nguyễn Ngọc Quỳnh Như, Nguyễn Công Bày, and Mai Thị Tuyết Nga, "Sự biến đổi của lượng coliforms và *Escherichia coli* gây nhiễm trên cá rô phi khi bảo quản ở nhiệt độ dương thấp", *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 54, no. 2, p. 195, 2018.

[10] Hoàng Quỳnh Hương and Nguyễn Thanh Hằng, "Nghiên cứu tình trạng kháng kháng sinh của một số chủng vi khuẩn Enterobacteriaceae gây nhiễm khuẩn huyết phân lập được tại bệnh viện đa khoa tỉnh thái bình năm 2018 - 2019", *Tạp chí Y học Việt Nam*, vol. 498, no. 2, pp. 47–50, 2021.

[11] H. W. Nichols and H. C. Bold, "Trichosarcina polymorpha Gen. et Sp. Nov", *J. Phycol.*, vol. 38, pp. 34–38, 1965.

[12] F. Hadj-Romdhane, P. Jaouen, J. Pruvost, D. Grizeau, G. Van Vooren, and P. Bourseau, "Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture", *Bioresour. Technol.*, vol. 123, pp. 366–374, 2012.

[13] Tiêu chuẩn Quốc gia, "TCVN 4884-1:2015 - Phương Pháp Định Lượng Vi Sinh Vật - Phần 1: Đếm Khuẩn Lạc Ở 30 Độ C Bằng Kỹ Thuật Đồ Địa", *Công thông tin Viện tiêu chuẩn chất lượng Việt Nam*, no. 1. 2015.

[14] T. D. P. Nguyen, M. Frappart, P. Jaouen, J. Pruvost, and P. Bourseau, "Harvesting *Chlorella vulgaris* by natural increase in pH: Effect of medium composition", *Environ. Technol. (United Kingdom)*, vol. 35, no. 11, pp. 1378–1388, Jun. 2014.

[15] T. D. P. Nguyen, T. N. T. Tran, T. V. A. Le, T. X. Nguyen Phan, P. L. Show, and S. R. Chia, "Auto-flocculation through cultivation of *Chlorella vulgaris* in seafood wastewater discharge: Influence of culture conditions on microalgae growth and nutrient removal", *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 127, no. 4, pp. 492–498, 2019.

[16] T. D. P. Nguyen *et al.*, "Bioflocculation formation of microalgae-bacteria in enhancing microalgae harvesting and nutrient removal from wastewater effluent", *Bioresour. Technol.*, vol. 272, no. October 2018, pp. 34–39, 2018.

[17] M. Holanda, C. Besold, F. L. Sempere, P. C. Abreu, and L. Poersch, "Treatment of effluents from marine shrimp culture with biofloc technology: Production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (cyanobacteria) and nutrient removal", *J. World Aquac. Soc.*, no. 690462, 2021.

[18] J. Souza, A. Cardozo, W. Wasielesky, and P. C. Abreu, "Does the biofloc size matter to the nitrification process in Biofloc Technology (BFT) systems?", *Aquaculture*, vol. 500, pp. 443–450, 2019.

[19] N. Fatimah *et al.*, "The role of microbial quorum sensing on the characteristics and functionality of bioflocs in aquaculture systems", *Aquaculture*, vol. 504, pp. 420–426, 2019.

[20] J. M. Pacheco-Vega, M. A. Cadena-Roa, J. A. Leyva-Flores, O. I. Zavala-Leal, E. Pérez-Bravo, and J. M. J. Ruiz-Velazco, "Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp culture", *Aquac. Reports*, vol. 11, no. May, pp. 24–30, 2018.