



ẢNH HƯỞNG CỦA VI KHUẨN *BACILLUS* CHỌN LỌC LÊN LUÂN TRÙNG NƯỚC LỢ *BRACHIONUS PLICATILIS*

Phạm Thị Tuyết Ngân¹ và Trần Sương Ngọc¹

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 25/02/2013

Ngày chấp nhận: 20/08/2013

Title:

Effects of selected *Bacillus* bacteria on brackishwater rotifer *Brachionus plicatilis*

Từ khóa:

Brachionus plicatilis,
Bacillus sp., Cảm nhiễm
Vibrio harveyi

Keywords:

Brachionus plicatilis,
Bacillus, *Vibrio harveyi*
challenging

ABSTRACT

Effects of selected *Bacillus* bacteria on brackishwater rotifer *Brachionus plicatilis* were studied. The first experiment included three treatments and one control, to investigate the effects of strain B37 (*Bacillus cereus*), B41 (*Bacillus amyloliquefaciens*), and B67 (*Bacillus subtilis*) on growth and egg carrying ratio of rotifers. Rotifers collected from the first experiment were challenged to *Vibrio harveyi* in the second experiment. The survival rates of rotifers after susceptibility were determined. Results showed that the density of rotifers and rotifer carrying eggs in the treatments added with *Bacillus* bacteria were significantly higher than those of the control, and the highest values were obtained from the treatments with bacteria B37. *Bacillus* bacteria could control growth of *Vibrio*. Rotifer productivity was improved by adding *Bacillus* on the culture system. Rotifers in the treatments with *Bacillus* could maintain higher survival rates when challenged with *Vibrio harveyi*, however, the difference was not significantly different.

TÓM TẮT

Ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus* chọn lọc lên luân trùng nước lợ *Brachionus plicatilis* đã được nghiên cứu. Thí nghiệm 1 bao gồm 3 nghiệm thức và một đối chứng, nghiệm thức 1, lần lượt khảo sát ảnh hưởng của dòng vi khuẩn có lợi B37 (*Bacillus cereus*), B41 (*Bacillus amyloliquefaciens*), và B67 (*Bacillus subtilis*) và đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) lên tăng trưởng, tỷ lệ mang trứng của luân trùng. Luân trùng sau khi kết thúc thí nghiệm 1 đã được gây cảm nhiễm với *Vibrio harveyi* ở thí nghiệm 2. Tỷ lệ sống của luân trùng sau khi cảm nhiễm đã được xác định. Kết quả đạt được cho thấy mật độ luân trùng và cá thể luân trùng mang trứng ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng và đạt giá trị cao nhất ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn B37 (*Bacillus cereus*). Vi khuẩn *Bacillus* có khả năng lấn át vi khuẩn *Vibrio*. Năng suất luân trùng đã được cải thiện khi bổ sung vi khuẩn *Bacillus* vào hệ thống nuôi. Luân trùng ở nghiệm thức bổ sung *Bacillus* có thể duy trì tỷ lệ sống cao hơn khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *Vibrio harveyi*, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

1 GIỚI THIỆU

Thức ăn đóng vai trò quan trọng đến sự thành công trong quá trình nuôi nhiều loài động vật thủy sản. Mặc dù kỹ thuật sản xuất thức ăn nhân tạo cho ấu trùng thủy sản có nhiều tiến bộ, nhưng thức ăn tươi sống vẫn được xem là thức ăn rất quan trọng và có tiềm năng rất lớn trong sản xuất

giống (Trần Thị Thanh Hiền và *ctv.*, 2004). Trong đó luân trùng (*B. plicatilis*) là loại thức ăn có tiềm năng lớn trong ngành sản xuất giống, chúng được dùng làm thức ăn cho hơn 60 loài cá biển và 18 loài giáp xác; do chúng có kích thước nhỏ, bơi lội chậm và sống lơ lửng trong nước, có thể nuôi ở mật độ cao, cho năng suất cao và có thể được làm giàu với acid béo và chất kháng sinh... Ở Hoa Kỳ,

Theilaccer và McMaster đã công bố lần đầu tiên kết quả về *B. plicatilis* là một thức ăn tuyệt vời cho ấu trùng cá biển vào năm 1971 (Fulks và Main, 1991). Tại Trung Quốc, hầu hết các nghiên cứu về luân trùng *B. plicatilis* làm thức ăn cho ấu trùng cá biển được tiến hành từ năm 1980. Để đảm bảo cho nhu cầu phát triển nuôi trồng thủy sản ngày càng mạnh mẽ hơn thì vấn đề về số lượng và chất lượng con giống đã được đưa lên hàng đầu. Nuôi luân trùng dần trở thành một nghề nuôi thương phẩm thực sự. Hino (1993) cho rằng quần thể luân trùng có thể mang một số mầm bệnh do bị nhiễm các loài vi khuẩn cơ hội. Do vậy, sự phát triển của vi khuẩn trong bể nuôi luân trùng đã có những ảnh hưởng có lợi hay có hại tùy thuộc vào loại vi khuẩn hiện diện trong đó.

Gatesoupe *et al.* (1989) cho rằng sự hiện diện của vi khuẩn trong bể nuôi luân trùng với số lượng cao có thể gây hại cho ấu trùng sử dụng luân trùng vì luân trùng đã ăn những vi khuẩn này, từ đó dẫn đến sự tăng trưởng và tỉ lệ sống của ấu trùng thấp. Tuy nhiên cũng có nhiều nghiên cứu sử dụng vi khuẩn lactic trên luân trùng được thực hiện (Gatesoupe, 1990, 1991). Các nghiên cứu này chủ yếu dựa trên tác động dinh dưỡng của vi khuẩn đến vật nuôi. Kết quả cho thấy nhiều dòng vi khuẩn có tác dụng tăng năng suất nuôi luân trùng, do kích thích quá trình sinh sản vô tính, làm thức ăn trực tiếp hoặc tăng cường hấp thu dinh dưỡng. Một số loài vi khuẩn *Bacillus* đã được phân lập tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ đã được nuôi cấy cùng với luân trùng nhằm tìm hiểu và đánh giá ảnh hưởng của chúng đến tỷ lệ sống, tỷ lệ mang trứng trong quá trình phát triển của luân trùng (Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp, 2011). Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của các loài vi khuẩn hữu ích lên quần thể luân trùng thông qua chỉ tiêu tăng trưởng và tỉ lệ mang trứng của luân trùng trong phòng thí nghiệm và kiểm tra khả năng chịu đựng của luân trùng khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh *Vibrio*, để làm cơ sở ứng dụng vào sản xuất, nâng cao năng suất và chất lượng luân trùng.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Dụng cụ và trang thiết bị thí nghiệm bao gồm lưới lọc có các kích thước mắt lưới khác nhau (30, 60 và 300 μ m), nồi hấp tiệt trùng, kính lúp, máy đo pH, máy lắc, hệ thống sục khí... Các trang thiết

bị thu và phân tích mẫu vi sinh, chất lượng nước. Hóa chất: Glutaraldehyde 50 ppm, dung dịch Lugol, chlorine, KI, thiosulfate natri ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Môi trường chuyên biệt cho *Bacillus*, Nutrient Agar (NA) và Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS). Nguồn nước ngọt được lấy từ nguồn nước máy và nước ót (100%) có nguồn gốc từ huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Nước dùng cho nuôi luân trùng (25%) được pha từ 2 nguồn nước trên. Nước sau khi pha được xử lý bằng chlorine (30 ppm) trong 24 h. Sau đó dùng KI để kiểm tra hàm lượng Clo trước khi đưa vào sử dụng. Nếu còn chlorine thì trung hòa bằng thiosulfate natri ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Luân trùng có nguồn gốc từ Trường Đại học Gent, Bỉ được nuôi giữ giống tại Phòng thí nghiệm nuôi thức ăn tự nhiên thuộc Bộ môn Thủy sinh học Ứng dụng. Luân trùng được nhân giống 1 tháng trước khi tiến hành thí nghiệm. Để có được mật số luân trùng mong muốn và tỷ lệ luân trùng mang trứng cao, trước khi bố trí thí nghiệm luân trùng đã được nhân giống bằng cách nuôi trong các keo nhựa 10 L, với mật độ nuôi ban đầu là 250 - 300 cá thể/mL. Luân trùng được cho ăn bằng tảo *Chlorella* kết hợp với men bánh mì theo tỉ lệ 7:3. Sau khi luân trùng đã mang trứng tiến hành sát trùng luân trùng để được ấu trùng vô trùng theo qui trình đã được ứng dụng tại Trung Tâm Khảo Cứu *Artemia*, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Gent, Bỉ (Nguyễn Thị Ngọc Tinh *et al.*, 2010).

Các dòng vi khuẩn *Bacillus* thuần để thí nghiệm gồm B37 (*B. cereus*), B41 (*B. amyloliquefaciens*) và B67 (*B. subtilis*) có nguồn gốc từ ao nuôi tôm sú huyện Vĩnh Châu, Tỉnh Sóc Trăng (Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp, 2011). Tảo *Chlorella* được sử dụng cho luân trùng ăn với lượng 100.000 tế bào/luân trùng/ngày đêm (Trần Thương Ngọc và Nguyễn Hồng Lộc, 2006). Men bánh mì cho luân trùng ăn được tính theo công thức sau: $m(g) = 0.035Dt^{0.415} \times V$ (m: lượng men bánh mì cho bể luân trùng trong một ngày (g); Dt: Mật độ luân trùng tại thời điểm t (cá thể/mL); V: Thể tích bể nuôi (L)).

2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1 Thí nghiệm 1: Đánh giá ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus* lên sự tăng trưởng của quần thể luân trùng

Luân trùng vô trùng đã được bố trí trong các ống falcon 50 mL với mật độ ban đầu là 35 cá

thể/mL và được đặt trên máy lắc. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại. Các nghiệm thức được bố trí như sau:

- Nghiệm thức 1: Không bổ sung vi khuẩn (đối chứng: ĐC).
- Nghiệm thức 2: bổ sung vi khuẩn B37 (*B. cereus*), mật độ 10^6 CFU/mL.
- Nghiệm thức 3: bổ sung vi khuẩn B41 (*B. amyloliquefaciens*), mật độ 10^6 CFU/mL
- Nghiệm thức 4: bổ sung vi khuẩn B67 (*B. subtilis*), mật độ 10^6 CFU/mL.

Thí nghiệm được thực hiện 4 chu kỳ nuôi, mỗi chu kỳ kéo dài 4 ngày. Sau mỗi chu kỳ nuôi thu lại luân trùng trong cùng một nghiệm thức và nuôi mới hoàn toàn. Nguồn giống của chu kỳ thứ 2 lấy từ chu kỳ thứ 1 và tiếp tục như vậy cho đến chu kỳ 4.

2.2.2 Thí nghiệm 2: Gây cảm nhiễm luân trùng với *Vibrio* sau khi bổ sung *Bacillus*

Quần thể luân trùng ở chu kỳ 4 được thu vào cuối thí nghiệm 1, giữ riêng luân trùng theo 4 nghiệm thức riêng biệt. Bố trí thí nghiệm tương tự như thí nghiệm 1 (3 nghiệm thức và 1 đối chứng), nhưng ở 3 nghiệm thức và đối chứng đều được bổ sung vi khuẩn *V. harveyi*, mật độ gây cảm nhiễm là 10^8 CFU/mL., thí nghiệm được thực hiện trong 5 ngày.

2.3 Phương pháp thu thập, tính toán và xử lý số liệu

2.3.1 Chỉ tiêu môi trường và vi sinh

a. Các chỉ tiêu môi trường

Chỉ tiêu nhiệt độ và pH được đo cuối mỗi chu kỳ nuôi. Các yếu tố NO_2 , TAN được đo 4 ngày/lần. Nhiệt độ được đo bằng nhiệt kế thủy ngân. pH đo bằng máy đo pH. Các chỉ tiêu NO_2 và TAN được đo theo phương pháp Indo-phenol blue và Dianozium (APHA, 1995).

b. Phương pháp nuôi tăng sinh vi khuẩn

Môi trường nuôi tăng sinh là môi trường Luria Bertani (LB). Sau đó bỏ dịch nổi thu sinh khối tế bào lắng ở phía đáy, lọc lấy sinh khối vi khuẩn, sinh khối vi khuẩn được hòa tan vào nước muối sinh lý. Mật độ vi khuẩn đậm đặc được xác định bằng phương pháp đo OD tại bước sóng 600 nm (Leonel *et al.*, 2006).

c. Phương pháp phân tích mẫu vi sinh trên môi trường thạch

- Chỉ tiêu vi khuẩn (vi khuẩn tổng cộng, *Bacillus* và *Vibrio*) cuối mỗi chu kỳ nuôi.
- Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn *Bacillus* bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (Nguyễn Lâm Dũng, 1983).
- Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn tổng cộng và *Vibrio* bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (Baumann *et al.*, 1980).

2.3.2 Chỉ tiêu sinh học

Luân trùng đã được đếm mỗi ngày để xác định tỷ lệ sống. Mật độ luân trùng được xác định hằng ngày bằng cách sử dụng micropipet 100 μL , cố định và nhuộm màu bằng Lugol. Sau đó đếm trên kính lúp, không đếm những con không bắt màu Lugol (luân trùng chết). Tỷ lệ sống (%) = $(N_c/N_0) \times 100$ (N_c : Số luân trùng lúc kết thúc thí nghiệm; N_0 : Số luân trùng lúc bắt đầu thí nghiệm). Hệ số trùng: $\text{HST}(\%) = n/N$ (n : Số cá thể luân trùng mang trứng, N : Tổng số luân trùng đếm).

2.3.3 Xử lý số liệu

Số liệu đã thu thập được xử lý sơ bộ với chương trình Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm Statistica 5.0; sử dụng phép thử LSD. So sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức (ANOVA).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus* lên sự tăng trưởng của quần thể luân trùng

3.1.1 Biến động các yếu tố môi trường

a. Nhiệt độ và pH

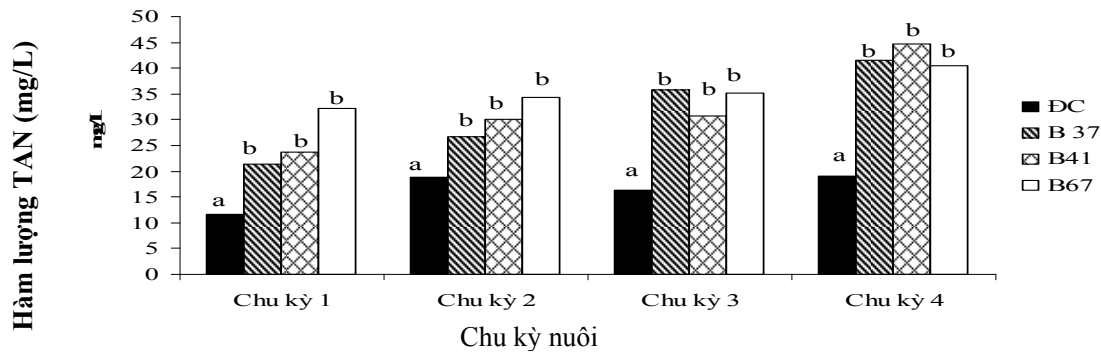
Do các thí nghiệm được bố trí trong cùng điều kiện môi trường, nhiệt độ ít biến động (29,1-30,53°C) và khác biệt nhau không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$), nhiệt độ trung bình giữa các nghiệm thức là 29,81°C, hoàn toàn thích hợp cho sự tăng trưởng của luân trùng. Theo Fulks và Main (1991) nhiệt độ dao động thích hợp cho luân trùng là 20-30°C. Dao động pH (6,87-7,07) không đáng kể ở tất cả các nghiệm thức và khác biệt nhau không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). pH có xu hướng giảm dần qua các chu kỳ thu mẫu, có thể là do cuối thí nghiệm mật độ luân trùng tăng cao và lượng tảo dư thừa từ quá trình cho ăn bắt

đầu phân hủy, làm gia tăng lượng CO₂ dẫn đến pH giảm nhẹ.

b. Tổng đạm amon TAN

Hàm lượng TAN ở các nghiệm thức đều có khuynh hướng tăng dần về cuối thí nghiệm (Hình 1). TAN trung bình thấp nhất là ở nghiệm thức ĐC (16,7 mg/L) và cao nhất ở nghiệm thức B67 (35,5 mg/L) và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Ở chu kỳ 1 hàm lượng TAN ở ĐC thấp nhất (11,6 mg/L), hàm lượng TAN cao nhất là ở chu kỳ 4 của nghiệm thức B41 (44,6 mg/L). Do quá trình tích lũy dinh dưỡng làm sản sinh ra một lượng lớn đạm ammonia, hàm lượng TAN tăng theo ngày nuôi và mật độ nuôi. Nhìn chung các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn

thì hàm lượng TAN luôn lớn hơn hoặc bằng so với nghiệm thức đối chứng, nguyên nhân là do sự phân hủy vật chất hữu cơ của vi khuẩn có trong môi trường nước nên đã làm hàm lượng TAN tăng lên. Theo Hirata và Nagata (1982, trích bởi Nogrady *et al.*, 1993) thì chất thải bài tiết của luân trùng phần lớn là ammonia dưới dạng hòa tan chủ yếu là ammonia và ure nên khi mật độ luân trùng càng cao thì TAN càng cao. Trong suốt mỗi chu kỳ nuôi hoàn toàn không thay nước, chính vì vậy mà tổng đạm amon luôn ở mức cao và tăng dần về cuối thí nghiệm và với thức ăn cho luân trùng là tảo *Chlorella*, nên một phần ion NH₄⁺ đã được tảo hấp thu, nhưng kết quả pH và nhiệt độ luôn ở mức thấp, do đó việc NH₃ được hình thành đến mức ảnh hưởng đến luân trùng là chưa xảy ra.



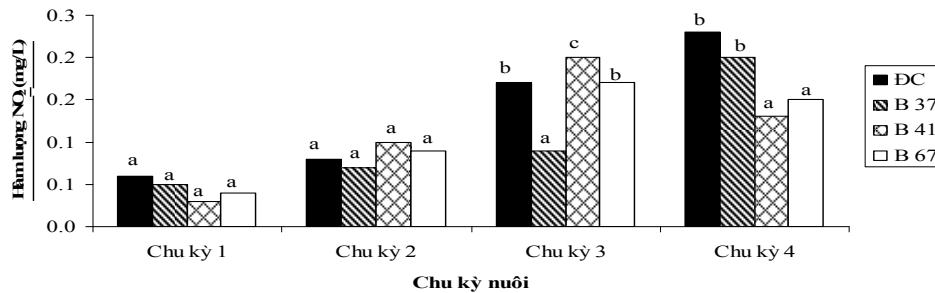
Hình 1: Hàm lượng TAN trung bình ở các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

Các giá trị trung bình của cột trong cùng 1 chu kỳ có ký tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

c. Nitrite (NO₂⁻)

NO₂⁻ ở các nghiệm thức biến động từ 0,03 - 0,23 mg/L (Hình 2). Qua hình này cho thấy ở chu kỳ 2, NO₂⁻ ở nghiệm thức B41 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với B37 và B67. NO₂⁻ ở chu kỳ

3 có khác biệt ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức B37 với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Hàm lượng nitrite trong thí nghiệm tương đối thấp không ảnh hưởng đến đời sống vật nuôi vì theo Groeneweg và Schluter (1981) hàm lượng NO₂⁻ từ 10-20 mg/L không gây độc cho luân trùng.



Hình 2: Hàm lượng NO₂⁻ trung bình ở các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

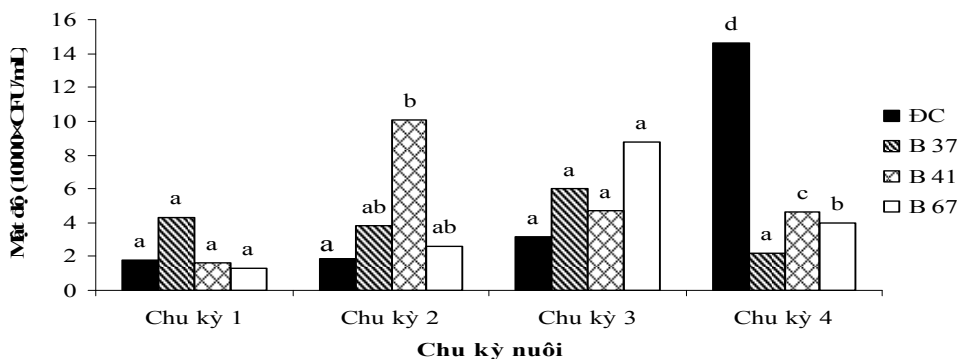
Các giá trị trung bình của cột trong cùng 1 chu kỳ có ký tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.1.2 Biến động mật độ vi khuẩn

a. Biến động mật độ vi khuẩn tổng cộng

Mật độ vi khuẩn tổng cộng đạt cao nhất là ở chu kỳ 4 của nghiệm thức đối chứng (1.5×10^5 CFU/mL), và thấp nhất là ở chu kỳ 1 ở nghiệm thức B67 ($1,3 \times 10^4$ CFU/mL) (Hình 3). Mật độ vi khuẩn tổng cộng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở chu kỳ 1 và 3. Mật độ vi khuẩn tổng cộng ở ĐC khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ở chu kỳ 4 ($p < 0,05$), điều này cho thấy tác dụng của việc bổ sung vi khuẩn

đã lần áp được các dòng vi khuẩn khác. Còn ở nghiệm thức ĐC không bổ sung vi khuẩn, mật độ vi khuẩn tổng cộng có khuynh hướng tăng dần, có thể mật độ vi khuẩn trong nghiệm thức ĐC tăng chủ yếu là nhóm vi khuẩn *Vibrio* và vi khuẩn tạp. Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn tổng cộng lại có sự biến động khác nhau giữa các chu kỳ thu mẫu ở từng nghiệm thức. Theo Hagiwata *et al.* (1994 trích bởi Rombaut *et al.*, 2001) thì một số vi khuẩn trong hệ thống nuôi luân trùng có thể được luân trùng sử dụng làm nguồn thức ăn, cho nên mật độ vi khuẩn có sự biến động giữa các chu kỳ thu mẫu.



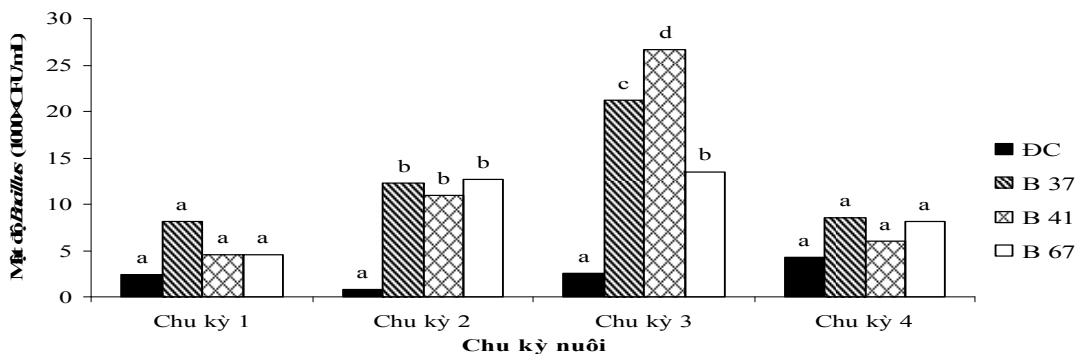
Hình 3: Mật độ vi khuẩn tổng cộng trung bình ở các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

Các giá trị trung bình của cột trong cùng 1 chu kỳ có ký tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

b. Biến động mật độ vi khuẩn Bacillus

Mật độ vi khuẩn *Bacillus* ở các nghiệm thức dao động từ $0,8 \times 10^3 - 2,7 \times 10^4$ CFU/mL, cao nhất là ở nghiệm thức B37 ($1,3 \times 10^4$ CFU/mL), thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng ($2,5 \times 10^3$ CFU/mL) (Hình 4). Ở chu kỳ 2 và chu kỳ 3 mật độ vi khuẩn *Bacillus* ở nghiệm thức ĐC khác biệt có ý nghĩa thống kê với 3 nghiệm thức

còn lại ($p < 0,05$). Mật độ vi khuẩn biến động theo từng chu kỳ thu mẫu, ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn mật số *Bacillus* luôn cao hơn nghiệm thức đối chứng, kết quả này cho thấy có sự liên quan đến việc bổ sung vi khuẩn định kỳ, chứng tỏ việc bổ sung vi khuẩn đã giữ được mật số vi khuẩn cao hơn rất nhiều so với ĐC.



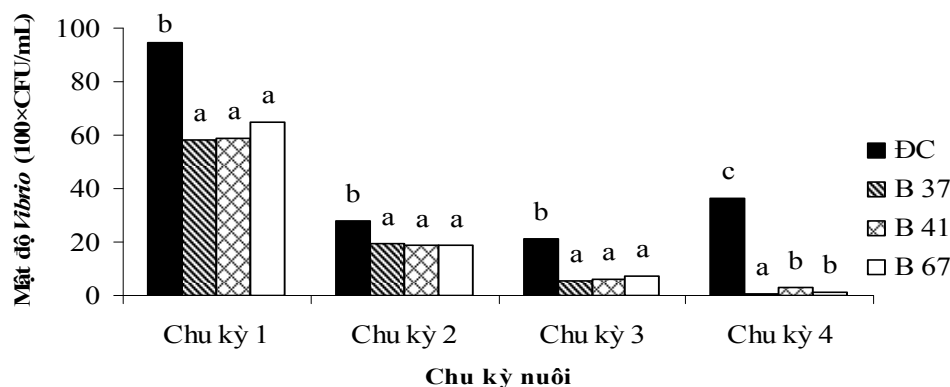
Hình 4: Mật độ vi khuẩn Bacillus trung bình ở các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

Các giá trị trung bình của cột trong cùng 1 chu kỳ có ký tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

c. Biến động mật độ vi khuẩn *Vibrio*

Mật độ *Vibrio* trong các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn thấp ($0,7 \times 10^2 - 2 \times 10^3$ CFU/mL), còn ở nghiệm thức đối chứng cao hơn ($1,7 - 9,5 \times 10^3$ CFU/mL) (Hình 5). Kết quả cho thấy ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn thì mật độ *Vibrio* có xu hướng giảm dần về cuối thí nghiệm, và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức ĐC và các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$), có thể là do việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus* định kỳ đã làm hạn chế sự phát triển của *Vibrio*. Trong khi

ở nghiệm thức đối chứng mật số *Vibrio* luôn cao hơn các nghiệm thức khác. Nguyên nhân là do sự tích lũy từ chất thải và thức ăn dư thừa của luân trùng trong quá trình nuôi là điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn *Vibrio* phát triển mà không bị ức chế bởi vi khuẩn *Bacillus*. Điều này cho thấy sự có mặt của các dòng vi khuẩn có lợi sẽ làm giảm mật độ vi khuẩn *Vibrio* trong môi trường nuôi. Theo Moriarty (1998) thì sự có mặt của các dòng vi khuẩn có lợi sẽ ức chế sự có mặt của các dòng vi khuẩn *Vibrio*.



Hình 5: Mật độ vi khuẩn *Vibrio* trung bình ở các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

Các giá trị trung bình của cột trong cùng 1 chu kỳ có ký tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.1.3 Sự phát triển của luân trùng

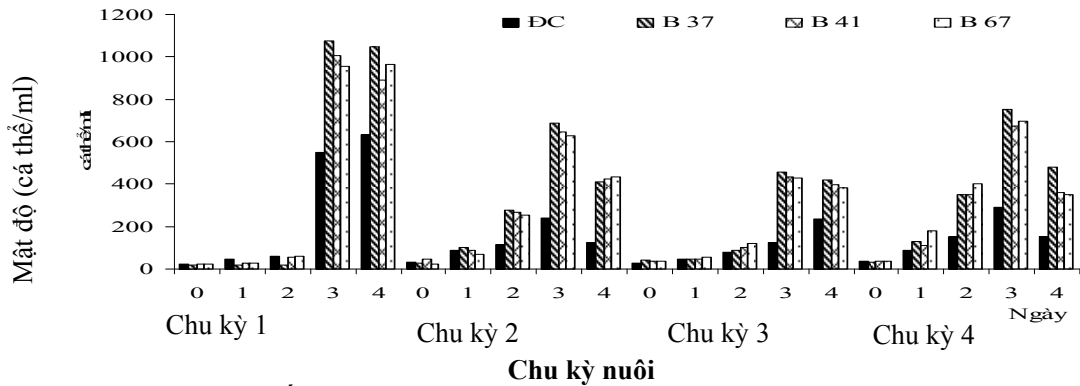
a. Biến động mật độ luân trùng

Mật độ luân trùng tăng rất nhanh và đạt cực đại ở ngày thứ 3 của mỗi chu kỳ. Điều này có thể do luân trùng bắt đầu mang trứng và sinh sản nhanh từ ngày thứ 2. Mật độ luân trùng trung bình ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn đều có giá trị cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức ĐC, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở 3 nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn (B37, B41, B67); điều này cho thấy sự có mặt của vi khuẩn trong thí nghiệm đã góp phần làm cho mật độ luân trùng tăng cao (Bảng 1; Hình 6). Nhìn chung, mật độ luân trùng ở các nghiệm thức cao nhất ở chu kỳ 1 và thấp ở các chu kỳ sau, mật độ luân trùng cao nhất là ở chu kỳ 1 của nghiệm thức B37 (1.074 cá thể/mL) và thấp nhất là ở nghiệm thức ĐC (76,8 cá thể/mL) ở chu

kỳ 3. Có thể do đây là thời điểm quần thể luân trùng vô trùng có sức sống cao và sức sinh sản nhanh sau khi được sát trùng trước khi bố trí thí nghiệm, với mật độ bố trí ban đầu là 35 cá thể/mL. Theo Rombaut, (1999), thì một số vi khuẩn trong hệ thống nuôi luân trùng có thể được luân trùng sử dụng làm nguồn thức ăn bổ sung tác dụng kích thích sự tăng trưởng và phát triển của luân trùng, một số vi khuẩn có tác dụng ức chế sự phát triển của các dòng vi khuẩn có hại tạo điều kiện tốt cho luân trùng phát triển.

Bảng 1: Năng suất luân trùng trung bình (cá thể/mL) của 4 chu kỳ nuôi

Nghiệm thức	Cá thể/mL
Đối chứng	157 ± 167
B37	324 ± 341
B41	302 ± 304
B67	307 ± 305

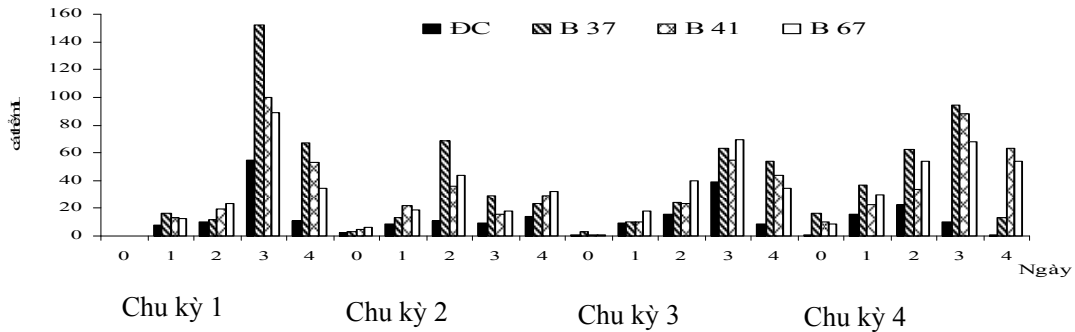


Hình 6: Biến động mật độ luân trùng qua các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

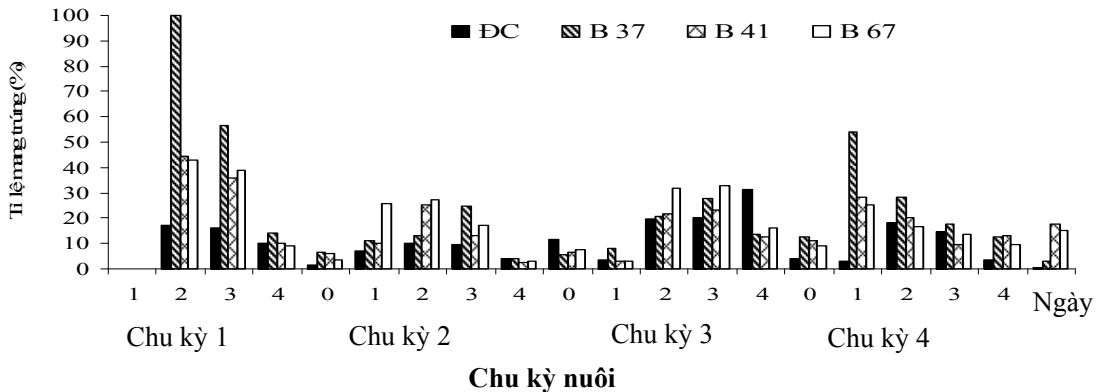
b. Biến động mật độ và tỷ lệ luân trùng mang trứng

Biến động mật độ luân trùng mang trứng được thể hiện qua Hình 7 và Hình 8. Sau 2 ngày nuôi, ở chu kỳ 1, nghiệm thức B37, luân trùng bắt đầu mang trứng nhiều và sinh sản nhanh, làm mật độ luân trùng mang trứng và tỉ lệ mang trứng tăng nhanh từ ngày thứ 3 lần lượt là 152 cá thể/mL và 142%. Trong khi đó ở ngày số 2, chu kỳ 1, mật độ luân trùng mang trứng đạt cao nhất chỉ 16,4 cá thể/mL và tỉ lệ mang trứng ở nghiệm thức B37 đạt

gần 100%. Trong khi ở nghiệm thức ĐC mật độ luân trùng mang trứng trung bình ở các chu kỳ thấp nhất (13 cá thể/mL) và mật độ luân trùng mang trứng ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn lần lượt là 40, 34 và 34 cá thể/mL. Khi mật độ luân trùng cao thì chất thải của luân trùng và lượng thức ăn dư thừa càng nhiều, sự phân hủy của chất thải sẽ một phần làm giảm chất lượng nước gây hạn chế sự sinh sản của luân trùng vì vậy mật độ luân trùng mang trứng giảm dần ở cuối mỗi chu kỳ nuôi.



Hình 7: Biến động mật độ luân trùng mang trứng qua các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm



Hình 8: Tỉ lệ (%) luân trùng mang trứng qua các ngày nuôi và chu kỳ nuôi của các nghiệm thức

3.2 Thí nghiệm 2: Gây cảm nhiễm luân trùng với vi khuẩn *Vibrio*

Sau thí nghiệm 1, luân trùng được thu và bố trí thí nghiệm cảm nhiễm với *Vibrio harveyi* (10^8 CFU/mL). Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 9. Bảng 2 cho thấy, trước khi gây cảm nhiễm, mật độ vi khuẩn *Vibrio* giữa các nghiệm thức khác nhau không ý nghĩa. Sau 5 ngày bổ sung vi khuẩn *Vibrio* thì mật độ vi khuẩn

Vibrio đã giảm đi đáng kể, trung bình chỉ còn 7×10^2 CFU/mL, và quần thể luân trùng cũng đã có sự suy giảm rõ rệt, đặc biệt là ở các nghiệm thức luân trùng có bổ sung *Bacillus* ở thí nghiệm trước. Theo Moriarty (1999), mật độ vi khuẩn *Vibrio* vượt quá 10^3 CFU/mL thì sẽ gây hại đến đối tượng nuôi, quần thể luân trùng ban đầu từ 474 con/mL giảm chỉ còn 14 con/mL.

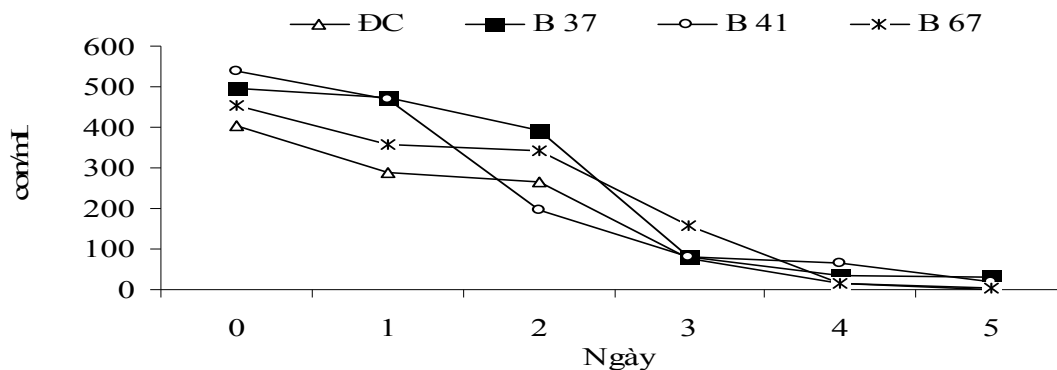
Bảng 2: Biến động mật độ vi khuẩn *Vibrio* trước và sau gây cảm nhiễm *Vibrio*

Nghiệm thức	Đối chứng	B37	B41	B67
Trước khi gây cảm nhiễm	$1,5 \times 10^8 \pm 12^a$	$2,5 \times 10^8 \pm 3^a$	$1,6 \times 10^8 \pm 4^a$	$2,2 \times 10^8 \pm 1^a$
Sau 5 ngày	$1,5 \times 10^3 \pm 64,4^a$	$0,4 \times 10^3 \pm 101^b$	$0,5 \times 10^3 \pm 198,4^b$	$0,3 \times 10^3 \pm 17,8^b$

Ghi chú: Các trị số trên cùng một hàng với ký tự giống nhau chỉ sự sai biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Qua Hình 9 cho thấy tốc độ suy giảm của luân trùng nhanh nhất là ở nghiệm thức ĐC, quần thể luân trùng đã chết hoàn toàn ở ngày thứ 5 trong khi đó ở 3 nghiệm thức còn lại mật độ luân trùng cũng giảm đáng kể. Có thể là do trong môi trường nuôi trước đó bổ sung vi khuẩn *Bacillus* nên sức đề kháng của luân trùng ở các nghiệm thức này

tốt hơn, đã có tác dụng duy trì mật độ luân trùng tốt hơn. Tuy nhiên, giữa các nghiệm thức này khác biệt không có ý nghĩa thống kê, có thể là do sau một thời gian dài ở thí nghiệm 1 (17 ngày) quần thể luân trùng đã bắt đầu chậm gia tăng mật số, khi gây cảm nhiễm với *Vibrio* sẽ làm cho quần thể nhanh chóng suy tàn.



Hình 9: Biến động mật độ luân trùng khi được gây cảm nhiễm với *Vibrio harveyi*

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Mật độ luân trùng và cá thể luân trùng mang trứng đạt giá trị cao nhất ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn B37 (*B. cereus*). Vi khuẩn *Bacillus* có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio*. Năng suất luân trùng đã được cải thiện khi bổ sung vi khuẩn *Bacillus* vào hệ thống nuôi. Luân trùng qua thời gian bổ sung với *Bacillus* có khả năng duy trì tỷ lệ sống tốt hơn khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi*, nhưng khác biệt không ý nghĩa so với đối chứng.

4.2 Đề xuất

Cần tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của việc sử dụng luân trùng có bổ sung vi sinh vật hữu ích trong quá trình nuôi với các phương pháp bổ sung khác nhau cũng như biện pháp gây cảm nhiễm *Vibrio* khác nhau. Nghiên cứu ảnh hưởng của luân trùng có bổ sung vi sinh vật hữu ích trong ương nuôi tôm, cá.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. APHA, AWWA, WEF, 1995. Standard method for the examination of water and wastewater (19

- th Edition). Washington DC, American Public Health Association (APHA).
2. Baumann, P., L. Baumann, S. S. Bang, and M. J. Woolkalis. 1980. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. *Curr. Microbiol.* 4:127 - 132.
 3. Fulks, W. and K. Main, 1991. The design and operation of commercial-scale live feeds production system. In: W. Fulks, K. Main (eds), Rotifer and microalgae culture system. Proceeding of a US-Asia workshop. The Oceanic institute, HI, pp: 25-52.
 4. Gatesoupe, F. J. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture* 89:139-148.
 5. Gatesoupe, F. J. 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96:335 - 342.
 6. Gatesoupe, F. J., T. Arakawa, and T. Watanabe. 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 83:39-44.
 7. Groeneweg, J. and Schluter, 1981. Mass production of freshwater rotifers on liquid wastes.II. in: Mass production of *Brachionus rubens* (Ehrenberg 1838) in the effluent of high rate algal ponds used for the treatment of piggery waste, *Aquaculture* 25: 25-33.
 8. Hino, A., 1993. Present culture systems of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the function of micro-organisms. In: C. S. Lee, M. S. Su and I. C. Liao (Eds). *Finfish Hatchery in Asia: Proc. Finfish Hatchery in Asia'91*. TML Conf. Proc. 3:51-59pp.
 9. Leonel, J.Ochoa-Solano, J. Olmos Soto, 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. In *food microbiology* 23: 519-525.
 10. Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in Penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358.
 11. Moriarty, D. J. W., 1999. Disease control in shrimp Aquaculture with probiotic bacteria. Biomangement system Pty. Ltd., 315 Main road, Wellington point. Queensland 4160 Australia and Department of Chemical Engineering. The University of Queensland. Qld. 4072 Australia.
 12. Nguyễn Lâm Dũng, 1983. Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp Hà Nội, 368 trang.
 13. Nguyen Thi Ngoc Tinh, Nguyen Ngoc Phuoc, K. Dierckens, P. Sorgeloos, P. Bossier, 2010. Gnotobiotically grown rotifer *Brachionus plicatilis* sensu strictu as a tool for evaluation of microbial function and nutritional value of different food types. *Aquaculture* 253: 421-432
 14. Nogrady. T., Walla. L., Snell, T. W. Rotifera: Vol 1. Biology, Ecology and systematic in: Dumont, H.J. Ed., *Guide to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. SPB Academic Publisher, the Hague, The Netherlands, 142pp.
 15. Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp, 2011. Định danh các nhóm vi khuẩn chuyên hóa đạm bằng phép thử sinh hóa và kỹ thuật sinh học phân tử. Kỷ yếu Hội nghị khoa học Thủy sản lần 4, Nhà xuất bản Nông nghiệp TP. HCM, trang 42 - 54.
 16. Rombaut G., Ph. Dhert, J. Vandenberghe, L. Verschuere, P. Sorgeloos, W. Verstraete, 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 176: 195-207.
 17. Rombaut, I.G, 2001. Control of microbial community in rotifer cultures (*Brachionus plicatilis*), PhD thesis.
 18. Trần Strong Ngọc và Nguyễn Hữu Lộc 2006. Nghiên cứu thiết lập hệ thống nuôi kết hợp luân trùng (*Brachionus plicatilis*) với bể nước xanh. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*: 82-91.
 19. Trần Thị Thanh Hiền, Trần Ngọc Hải, Nguyễn Văn Hòa, Trần Strong Ngọc, Nguyễn Thị Thanh Thảo, 2004. Bài giảng “Kỹ thuật nuôi thức ăn tự nhiên”.