

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

Phan Thái Tuyết Anh<sup>1</sup> và Phạm Thị Tuyết Ngân<sup>1</sup>

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

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 07/03/2014

Ngày chấp nhận: 30/12/2014

### Title:

Influence of selected mixture *Bacillus* bacteria on brackish rotifer *Brachionus plicatilis*

### Từ khóa:

*Brachionus plicatilis*,  
*Bacillus* sp., cảm nhiễm  
*Vibrio harveyi*

### Keywords:

*Brachionus plicatilis*,  
*Bacillus*, *Vibrio harveyi*  
challenging

### ABSTRACT

The aims of this research were to study the impacts of mixed selective *Bacillus* sp bacteria on the growth of rotifers *Brachionus plicatilis*. The first experiment was investigated the effects of a mixture of *Bacillus* sp and probiotic products on rotifer populations with two treatments and one control: (1) No adding bacteria for the control treatment, (2) Adding a mixture of *Bacillus* B7 + B41 (*Bacillus amyloliquefaciens*), (3) Adding Pro W (probiotic products) to culture rotifer medium. In the second experiment, after accomplishing the first experiment, rotifers from each treatment were infected by *Vibrio harveyi* to determine the survival rate after the infection. Results showed that the density of rotifers, carrying eggs in the treatments added *Bacillus* was significantly higher than those in the control ( $p < 0.05$ ). In addition, the highest results were obtained from the treatments with mixture of *Bacillus* B7 + B41 (*Bacillus amyloliquefaciens*), this *Bacillus* strain possibly overwhelmed *Vibrio* bacteria. The rotifer productivity has been improved when adding *Bacillus* as well as microbial products into the culture system. Rotifers in the medium adding *Bacillus* can maintain a higher survival rate under the infection of *Vibrio harveyi* bacteria, but the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

### TÓM TẮT

Nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus* sp chọn lọc lên tăng trưởng của luân trùng nước lợ *Brachionus plicatilis* được nghiên cứu. Thí nghiệm I, khảo sát ảnh hưởng của hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus* sp và chế phẩm vi sinh lên quần thể luân trùng, thí nghiệm được bố trí 2 nghiệm thức và một đối chứng: (1) Đối chứng (không bổ sung vi khuẩn); (2) Bổ sung hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus* B7 + B41 (*Bacillus amyloliquefaciens*); (3) Bổ sung chế phẩm vi sinh Pro W lên tỷ lệ sống tỷ lệ tăng trưởng của vi khuẩn. Thí nghiệm II, sau khi kết thúc thí nghiệm I luân trùng ở từng nghiệm thức sẽ được gây cảm nhiễm với vi khuẩn *Vibrio harveyi*, xác định tỷ lệ sống của luân trùng sau khi gây cảm nhiễm. Kết quả 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 hỗn hợp vi khuẩn B7 + B41 (*Bacillus amyloliquefaciens*), vi khuẩn *Bacillus* có khả năng lấn át *Vibrio*. Năng suất luân trùng đã được cải thiện khi bổ sung vi khuẩn *Bacillus* cũng như chế phẩm vi sinh 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 ( $p > 0,05$ ).

## 1 GIỚI THIỆU

Trong sản xuất giống thì thức ăn và kỹ thuật cho ăn trong khi ương ấu trùng là vấn đề rất quan trọng vì vậy thức ăn tự nhiên đóng vai trò rất quan trọng quyết định sự thành công trong ương nuôi nhiều loài động vật thủy sản (Trần Thị Thanh Hiền và *ctv.*, 2007).

Luân trùng nước lợ (*Brachionus plicatilis*) được nuôi và sử dụng trong sản xuất giống của hơn 60 loài cá biển và 18 loài giáp xác (Nagata, 1989). Nhờ có kích thước nhỏ, bơi lội chậm chạp, sống lơ lửng trong nước làm cho luân trùng trở thành con mồi thích hợp cho ấu trùng các loài cá và giáp xác biển có kích thước miệng nhỏ (Snell và Carrillo, 1984). Hơn nữa, do đặc điểm ăn lọc không chọn lọc nên luân trùng có thể được giàu hoá bằng các chất dinh dưỡng cần thiết hay kháng sinh để đưa vào cơ thể ấu trùng nuôi (Lubzens *et al.*, 1989). Vì vậy, luân trùng đã trở thành nguồn thức ăn tươi sống không thể thiếu trong sản xuất giống của nhiều loài giáp xác và cá biển.

Các nhà nghiên cứu từ lâu đã quan tâm đến việc nghiên cứu đặc điểm sinh học, kỹ thuật nuôi một số loại thức ăn tươi sống cho ấu trùng động vật thủy sản. Quan tâm các đối tượng chủ yếu như: vi tảo, luân trùng, giáp xác râu ngành, *Artemia*, trùng chỉ (Trần Thanh Hiền và *ctv.*, 2007).

Nhật Bản là nơi đầu tiên thực hiện nghiên cứu nuôi sinh khối luân trùng vào năm 1964 (Hirata, 1979; trích từ Trần Công Bình, 2006). Ở Trung Quốc, năm 1980, các nghiên cứu về luân trùng làm thức ăn cho ấu trùng cá biển được tiến hành (Chen, 1991; trích dẫn từ Trần Thị Thanh Hiền và *ctv.*, 2007). Ở Hoa Kỳ, năm 1971, Theilacker và McMaster đã công bố lần đầu tiên kết quả nghiên cứu về *Brachionus plicatilis* là thức ăn tuyệt vời cho ấu trùng cá biển (Wendy và Kenvan, 1991). Tuy nhiên, đến nay thì luân trùng vẫn được nuôi ở qui mô thí nghiệm, chủ yếu phục vụ cho ương nuôi các loài Mullet, cá măng, Pacific threatfin và mahimah, Red drum, cá chêm trắng và California halibut. Sản lượng nuôi mỗi ngày thường đạt 100-500 triệu con, năng suất trung bình 25,7-75 cá thể/ml/ngày).

Hino (1991) cho rằng sự thay đổi của quần thể vi khuẩn hay sự nhiễm tạp của các loài khác sẽ ảnh hưởng đến quá trình nuôi luân trùng. Các loại vi khuẩn trong bể nuôi luân trùng phát triển sẽ có những ảnh hưởng có lợi hay có hại tùy thuộc vào loại vi khuẩn. 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. 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 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 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  $\mu\text{m}$ ), 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 ruộng muối 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 24h. 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. Các dòng vi khuẩn *Bacillus* thuần gồm B7, B41 (*B. amyloliquefaciens*) 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 Sương Ngọc và Nguyễn Hồng Lộc, 2006).

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phương pháp sát trùng luân trùng để tạo con non vô trùng

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*. 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).

Chất khử trùng được sử dụng: Glutaraldehyde, nồng độ sử dụng 200 ppm, thời gian sát trùng 1 giờ trong nước biển 25‰ đã được tiệt trùng. Qui trình thực hiện như sau: Trứng amictic từ luân trùng mang trứng đã được đếm và tính toán để có được mật độ luân trùng mong muốn ban đầu theo nhu cầu của thí nghiệm. Sau đó luân trùng mang trứng được rửa sạch với nước biển 25‰, lọc qua lưới có kích thước mắt lưới 300 µm sau đó rửa sạch lại nhiều lần qua lưới 60 µm. Cô đặc luân trùng trước khi tiến hành cho dung dịch glutaraldehyde 200 ppm vào. Sau 1 giờ, luân trùng trong mỗi ống sẽ được lọc qua lưới 60 µm nhằm loại bỏ xác luân trùng đã chết sau đó lọc và rửa lại nhiều lần qua lưới 30 µm để giữ lại tất cả các trứng amictic, trứng được ấp trong chai chứa 250 mL nước 25‰ và được đặt trên máy lắc. Sau 3 giờ các trứng amictic đã được nở ra, để yên trong khoảng 1 phút để cho luân trùng đã chết lắng hết xuống đáy. Tiến hành thu phân trên đồ vào chai mới, xác định số lượng luân trùng mới nở và tiến hành bố trí thí nghiệm.

### Bố trí thí nghiệm

**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 30 cá thể/mL và được đặt trên máy lắc. Thí nghiệm gồm 3 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 B7+ B41 (*B. amyloliquefaciens*), mật độ  $10^7$  CFU/mL
- Nghiệm thức 4: Bổ sung chế phẩm vi sinh Pro W mật độ  $10^7$  CFU/mL.
- Thành phần của chế phẩm vi sinh Pro W trong 1 g:
  - *Bacillus subtilis*  $2.5 \times 10^{12}$  CFU/g
  - *Bacillus licheniformis*  $2.5 \times 10^{12}$  CFU/g

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.

**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 (2 nghiệm thức và 1 đối chứng), nhưng ở 2 nghiệm thức và đối chứng đều được bổ sung vi khuẩn *V. harveyi*, mật độ gây cảm nhiễm là  $10^7$  CFU/mL, thí nghiệm được thực hiện trong 6 ngày.

### 2.2.2 Các chỉ tiêu theo dõi

Chỉ tiêu nhiệt độ và pH được đo cuối mỗi chu kỳ nuôi. Các yếu tố NO<sub>2</sub>, TAN được đo 4 ngày/lần; chỉ tiêu vi khuẩn (vi khuẩn tổng cộng, *Bacillus* và *Vibrio*) cuối mỗi chu kỳ nuôi và chỉ tiêu sinh học (số luân trùng, tỷ lệ luân trùng mang trứng) được xác định mỗi ngày.

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

### 2.3.1 Chỉ tiêu môi trường và vi sinh

Nhiệt độ được đo bằng nhiệt kế thủy ngân. pH đo bằng máy đo pH. Các chỉ tiêu NO<sub>2</sub> và TAN được đo theo phương pháp Indo – phenol blue và Dianozium (APHA, 1995).

#### a. Phương pháp nuôi tăng sinh vi khuẩn

Vi khuẩn *Bacillus* B7, B41 đã trữ ở phòng vi sinh được cấy truyền trên môi trường chuyên biệt cho vi khuẩn *Bacillus* hoặc môi trường TSA hoặc NA, sau đó dùng que cấy lấy một ít khuẩn lạc cấy vào ống nghiệm có chứa môi trường TSB, để lên máy lắc ở nhiệt độ 30°C. Sau 24 giờ thấy ống nghiệm chứa dung dịch vi khuẩn chuyển sang màu hơi đục. Chuyển 5 mL dung dịch chứa vi khuẩn sang bình tam giác có chứa 450 mL môi trường lỏng (TSB). Sau 24 giờ thu được 500 mL dung dịch chứa vi khuẩn cần nuôi tăng sinh.

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

– 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)

#### 2.4 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  $\mu$ L, 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: HST(%) =  $n/N$  ( $n$ : Số cá thể luân trùng mang trùng,  $N$ : Tổng số luân trùng đếm).

#### 2.5 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

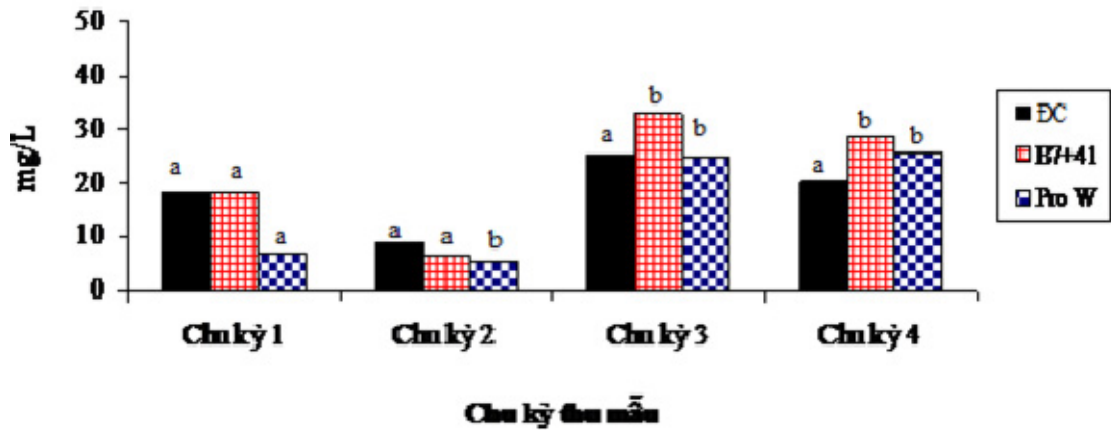
Nhiệt độ giữa các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn và không bổ sung vi khuẩn trong thí nghiệm khác biệt không ý nghĩa ( $p > 0,05$ ), nhiệt độ ít biến động, nhiệt độ dao động khoảng 25,3 – 29,5 $^{\circ}$ C. Nhiệt độ dao động không đáng kể là do thí nghiệm đều được bố trí trong phòng thí nghiệm và cùng điều kiện môi trường, vì vậy sự tác động của nhiệt độ bên ngoài vào là như nhau. Theo Fulks (1991) nhiệt độ dao động thích hợp cho luân trùng là 20 – 30 $^{\circ}$ C vì vậy nhiệt độ trong thí nghiệm nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển của luân trùng. pH có khuynh hướng giảm trong các chu kỳ nuôi do sử dụng thức ăn hoàn toàn là tảo nên ở cuối vụ lượng tảo dư thừa và bắt đầu phân hủy sẽ làm tăng lượng CO<sub>2</sub> sẽ làm giảm pH, do giá trị pH phụ thuộc

vào nhiều yếu tố trong đó sự hấp thu nguồn đạm khác nhau cũng dẫn đến sự biến đổi pH của môi trường có tảo.

###### b. Tổng đạm amon TAN

Kết quả biến động hàm lượng TAN ở thí nghiệm được trình bày ở Hình 1 cho thấy ở các nghiệm thức hàm lượng TAN đều có khuynh hướng tăng nhanh và cao, ở nghiệm thức ĐC có hàm lượng TAN trung bình thấp nhất (18,13  $\pm$  6,8 mg/L) và cao nhất là ở nghiệm thức B7 + B41 (21,54  $\pm$  11,8 mg/L) khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức còn lại qua các chu kỳ thu mẫu ( $p < 0,05$ ). Ở chu kỳ 2 hàm lượng TAN ở nghiệm thức ĐC thấp nhất (1,12 mg/L), cao nhất ở chu kỳ 4 nghiệm thức B7 + B41 (29,64 mg/L). Càng về cuối thí nghiệm thì hàm lượng TAN càng tăng dần do quá trình tích lũy dinh dưỡng, TAN là tổng hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NH<sub>3</sub> có trong môi trường nước được gọi là tổng đạm amon, có liên quan đến mật số các vi khuẩn chuyển hóa đạm. Do mật độ nuôi luân trùng ở cuối chu kỳ càng nhiều thì số lượng cho ăn càng cao khi đó sẽ có sự tích tụ và phân hủy thức ăn dư thừa cũng như chất thải của luân trùng sẽ làm tăng hàm lượng TAN trong thí nghiệm.

Nhìn chung lượng TAN ở nghiệm thức có bổ sung 10<sup>7</sup> CFU/mL vi khuẩn *Bacillus* cũng như chế phẩm vi sinh cao hơn nhiều so với nghiệm thức đối chứng. Như vậy, ở nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *Bacillus*, chế phẩm vi sinh với mật độ cao đã tham gia phân hủy vật chất hữu cơ chuyển sang NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> làm cho hàm lượng TAN tăng một cách đáng kể. Theo Hirata và Nagata (1982) chất thải và chất 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 tăng cao thì TAN cao. Trong mỗi chu kỳ nuôi hoàn toàn không thay nước và thức ăn cho luân trùng là tảo nên một phần ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (một dạng phân đạm ưa chuộng của thực vật) đã được tảo hấp thu, nên TAN luôn ở mức cao và tăng dần về cuối thí nghiệm.

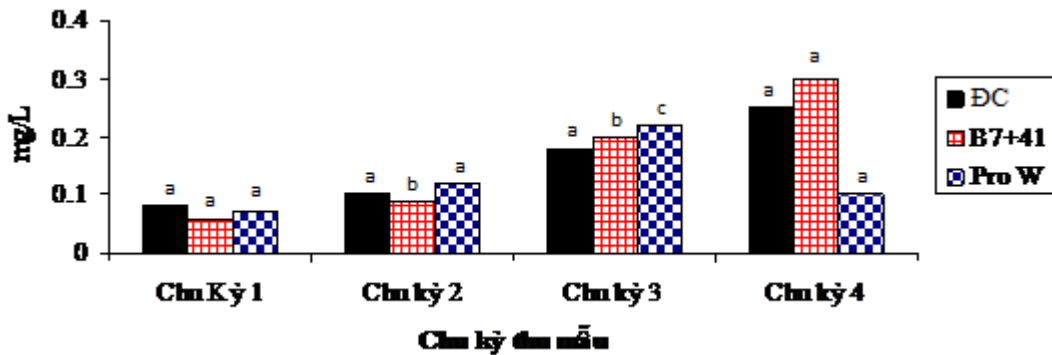


Hình 1: Hàm lượng TAN trung bình ở các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

c. Nitrite ( $NO_2^-$ )

Kết quả thí nghiệm trình bày ở Hình 2 cho thấy, hàm lượng  $NO_2^-$  ở chu kỳ 4 cao hơn ở chu kỳ 1 và chu kỳ 2,3. Hàm lượng  $NO_2^-$  trung bình ở các nghiệm thức dao động từ 0,03 – 0,35 mg/L. Hàm lượng  $NO_2^-$  ở chu kỳ 3 ở nghiệm thức Pro W khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ĐC (đối chứng) ( $p < 0,05$ ), nghiệm thức Pro W lớn hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức B7 + B41, ở

chu kỳ 4 khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức B7 + B41 với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Do các thức ăn dư thừa và chất thải của luân trùng nên hàm lượng các chất dinh dưỡng gốc đạm có khuynh hướng gia tăng vào cuối thí nghiệm. Hàm lượng nitrite trung bình của tất cả các nghiệm thức là 0,14 mg/L hoàn toàn không gây hại đối với luân trùng. Theo Groeneweg và Schluter (1981), thì hàm lượng  $NO_2^-$  từ 10 – 20 mg/L thì không gây độc cho luân trùng.



Hình 2: Hàm lượng  $NO_2^-$  trung bình ở các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

3.1.2 Biến động mật độ vi khuẩn

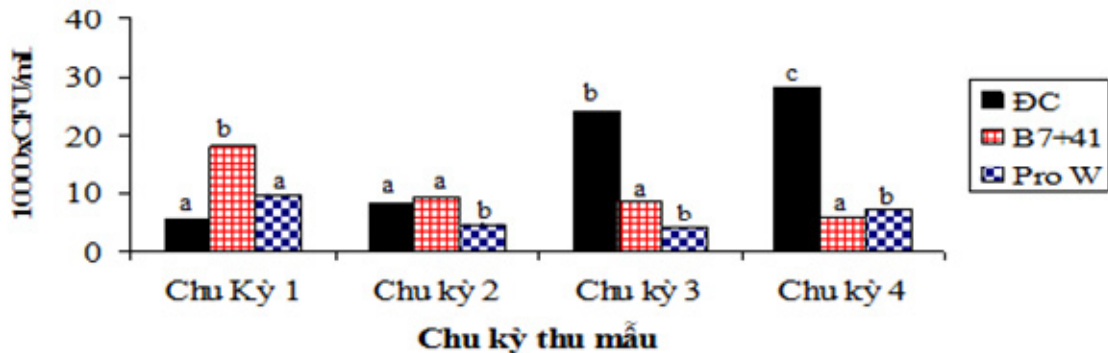
a. Biến động mật độ vi khuẩn tổng cộng

Mật độ vi khuẩn tổng cộng đạt cao nhất qua kết quả phân tích là ở chu kỳ 4 của nghiệm thức đối chứng ( $16,6 \times 10^4$  CFU/mL), thấp nhất là ở chu kỳ 2 nghiệm thức Pro W ( $6,4 \times 10^4$  CFU/mL) được trình bày ở Hình 3. Mật độ vi khuẩn tổng cộng có giá trị trung bình ở các nghiệm thức ĐC, B7 + B41, Pro W lần lượt là  $16,6 \times 10^4$  CFU/mL,  $10,5 \times 10^4$  CFU/mL,  $6,4 \times 10^4$  CFU/mL. Qua Hình 3 cho thấy mật độ vi khuẩn ở các nghiệm thức khác biệt không có ý

nghĩa thống kê ở các chu kỳ ( $p > 0,05$ ). Mật độ vi khuẩn tổng của nghiệm thức đối chứng 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 vi khuẩn bổ sung cũng như chế phẩm vi sinh bổ sung vào các nghiệm thức có khả năng ức chế các dòng vi khuẩn còn lại. Ở nghiệm thức ĐC do không có bổ sung vi khuẩn nên mật số vi khuẩn tổng tăng dần vào cuối mỗi chu kỳ, có thể là do vi khuẩn *Vibrio* và các vi khuẩn khác, ở nghiệm thức Pro W thì vi khuẩn tổng cộng có khuynh hướng giảm dần điều này chứng tỏ khả năng cải thiện môi

trường cũng như tạo ra các dòng kháng khuẩn của chế phẩm vi sinh. Mật độ vi khuẩn tổng có sự biến động khác nhau giữa các chu kỳ thu mẫu cũng như ở từng nghiệm thức. Theo Hagiwata (1995), trích

bởi Rombaut, 2001, một số vi khuẩn trong hệ thống nuôi luân trùng sử dụng làm nguồn thức ăn, cho nên mật độ vi khuẩn có sự biến động giữa các chu kỳ thu mẫu.

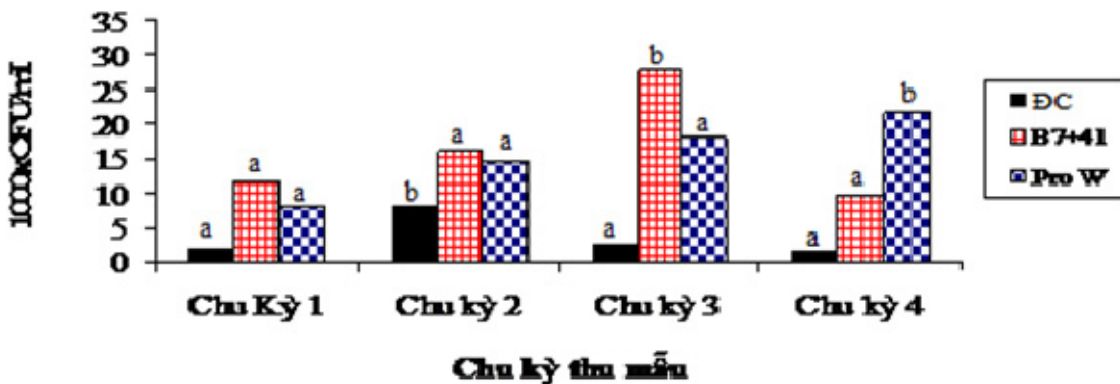


**Hình 3: Mật độ vi khuẩn tổng cộng trung bình ở các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm**

*b. Biến động mật độ vi khuẩn Bacillus*

Mật độ vi khuẩn *Bacillus* dao động từ  $2,05 \times 10^3$  –  $27,95 \times 10^3$  CFU/mL, cao nhất ở nghiệm thức B7 + B41 có giá trị trung bình từ  $16,38 \times 10^3 \pm 8,16$  CFU/mL, nghiệm thức đối chứng thấp nhất có giá trị trung bình  $3,67 \times 10^3 \pm 3,07$  CFU/mL ở Hình 4. Mật độ vi khuẩn *Bacillus* ở nghiệm thức ĐC của chu kỳ 1, chu kỳ 2 khác biệt có ý nghĩa thống kê với 2 nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Mật độ vi

khuẩn biến động theo từng chu kỳ thu mẫu, các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cũng như chế phẩm vi sinh thì mật độ vi khuẩn *Bacillus* sẽ cao hơn nghiệm thức đối chứng, điều này xảy ra là do vi khuẩn *Bacillus* được bổ sung định kỳ, ban đầu mật độ *Bacillus* thấp và tăng lên sau khi được bổ sung vào, càng về cuối thí nghiệm thì mật độ *Bacillus* ổn định dần, mật số vi khuẩn cao hơn với không bổ sung.



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

*c. Biến động mật độ vi khuẩn Vibrio*

*Vibrio* ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn và chế phẩm vi sinh dao động từ  $1,3 \times 10^2$  –  $72,6 \times 10^2$  CFU/mL, còn ở nghiệm thức đối chứng dao động từ  $4,3 \times 10^3$  –  $9,4 \times 10^3$  CFU/mL. Ở Hình 5 cho thấy ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cũng như chế phẩm vi sinh thì thấy mật độ *Vibrio* giảm dần

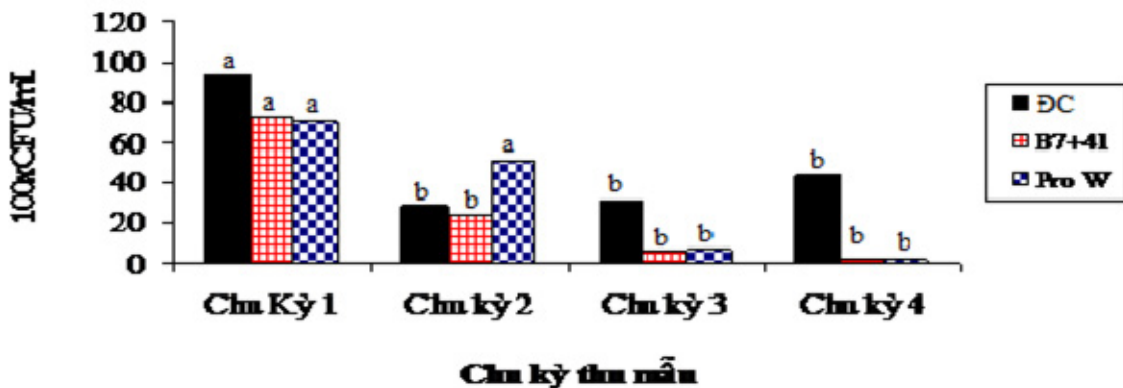
về cuối thí nghiệm, khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức ĐC và các nghiệm thức còn lại ở các chu kỳ cuối ( $p < 0,05$ ), điều này chứng tỏ nếu bổ sung vi khuẩn *Bacillus* định kỳ sẽ làm giảm sự phát triển của *Vibrio*, ở nghiệm thức ĐC mật độ *Vibrio* luôn dao động và không ổn định, do sự tích lũy thức ăn dư thừa và chất thải của luân trùng làm

cho môi trường nước trở nên xấu đi, đó là điều kiện thuận lợi cho *Vibrio* phát triển và nếu bổ sung các vi khuẩn có lợi sẽ kiểm hãm mật độ *Vibrio* trong môi trường nuôi.

Theo Rengipipat *et al.* (1998), cho rằng bào tử *Bacillus* như một tác nhân sinh học giúp làm giảm bệnh *Vibrio* trong hệ thống nuôi thủy sản. Nghiên cứu của Hasting và Nealson (1981) cho rằng *Bacillus* có thể tạo ra một số chất kháng khuẩn hoặc một vài sản phẩm có thể tiêu diệt *Vibrio harveyi*. Theo Trần Thị Thu Hiền (2010) vi khuẩn *Bacillus* trong quá trình phát triển có thể sản sinh ra chất kiểm hãm, ức chế với các vi khuẩn gây

bệnh thông qua một số cơ chế cạnh tranh oxy, chất dinh dưỡng, cạnh tranh vị trí và sản sinh ra các chất ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh. Một số nghiên cứu đã cho thấy vi khuẩn *Bacillus* có khả năng khống chế bệnh dịch bằng cách ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh *Vibrio*, thúc đẩy quá trình thực bào, tăng hoạt động của Melanin và kháng khuẩn.

Theo Moriarty (1999), mật độ vi khuẩn *Vibrio* vượt quá  $10^3$  CFU/mL sẽ gây hại đến đối tượng nuôi, vì vậy trong suốt thí nghiệm mật độ *Vibrio* nằm trong giới hạn cho phép và không ảnh hưởng đến quần thể luân trùng.



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

### 3.1.3 Sự phát triển của luân trùng

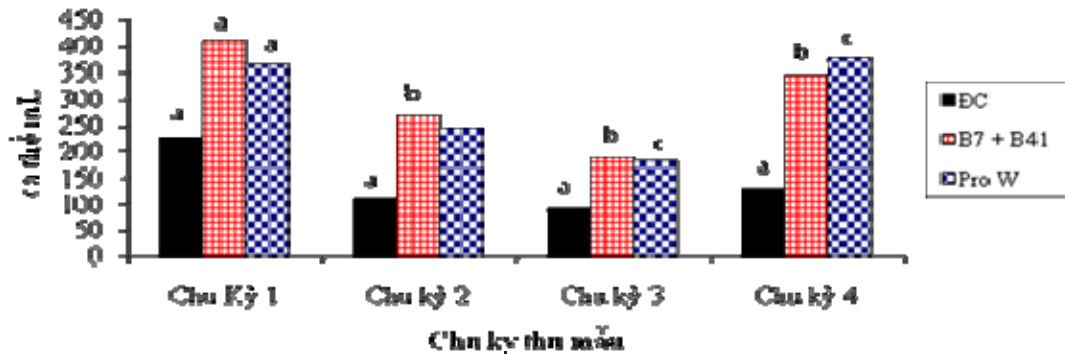
#### a. Biến động mật độ luân trùng

Tốc độ tăng trưởng của luân trùng trong 4 chu kỳ nuôi phát triển ổn định và tăng rất nhanh. Điều này chứng tỏ luân trùng bắt đầu mang trứng và sinh sản nhanh từ ngày thứ 2. Mật độ luân trùng trong 2 ngày đầu tăng giống nhau không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ) và tăng nhanh vào những ngày cuối của chu kỳ, mật độ bố trí ban đầu là 30 cá thể/mL. Ở mỗi chu kỳ mật độ luân trùng thường sẽ đạt giá trị cao vào ngày thứ 3, mật độ luân trùng ở nghiệm thức B7 + B41 ở chu kỳ 1 là cao nhất, mật độ đạt 1.000,78 cá thể/mL, mật độ trung bình cũng cao nhất là 401,62 cá thể/mL, thấp nhất là ở nghiệm thức ĐC là 92,46 cá thể/mL. Ở nghiệm thức B7 + B41 và nghiệm thức Pro W thì mật độ luân trùng trung bình đều có giá trị cao hơn so với nghiệm thức ĐC. Kết quả này hoàn toàn không chịu ảnh hưởng bởi yếu tố thức ăn vì lượng thức ăn cung cấp vào cho luân trùng ở tất cả các nghiệm thức đều như nhau. Ở chu kỳ 1 mật độ luân trùng cao nhất ở nghiệm thức B7 + B41, ở các chu kỳ sau

mật độ luân trùng bắt đầu ổn định nên không tăng cao. Do một chu kỳ chỉ kéo dài 4 ngày sẽ không thấy rõ sự khác biệt giữa các nghiệm thức nên đến chu kỳ 2, 3 mới thấy rõ sự tăng trưởng và phát triển của quần thể luân trùng.

Phân tích cho thấy ở nghiệm thức ĐC thì mật độ luân trùng khác biệt có ý nghĩa thống kê với hai nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ), điều này chứng tỏ khi bố trí vi khuẩn cũng như chế phẩm vi sinh sẽ làm cho mật độ luân trùng tăng đáng kể do môi trường nuôi ngày càng xấu cũng như mật độ luân trùng càng cao sẽ làm mật độ luân trùng giảm dần vào cuối mỗi chu kỳ nuôi, ảnh hưởng đến kết quả sự phát triển của luân trùng.

Theo Hagiwata (1995, trích bởi Rombaut, 2001), 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.

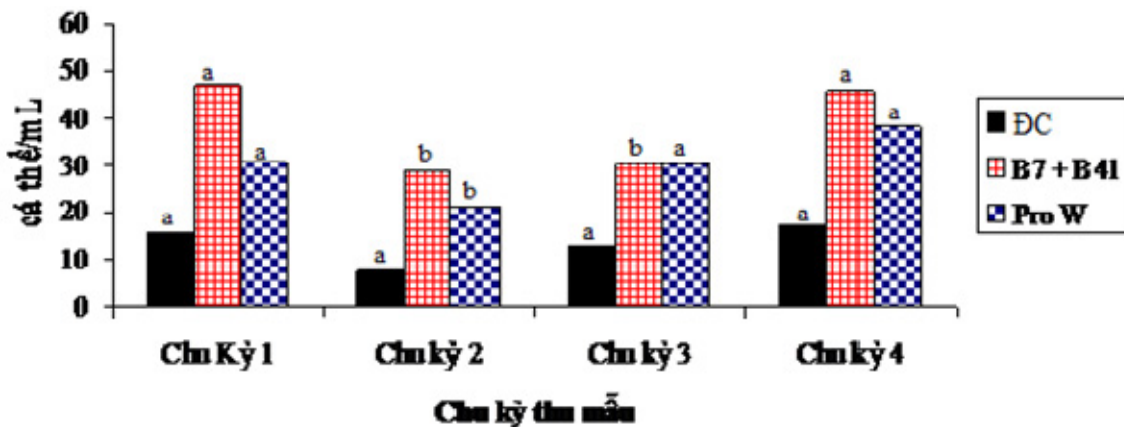


Hình 6: Biến động mật độ luân trùng qua các chu kỳ nuôi trong thí nghiệm

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

Tỷ lệ luân trùng mang trứng được thể hiện ở Hình 7, mật độ luân trùng mang trứng sẽ gia tăng theo mật độ luân trùng, tỷ lệ mang trứng của luân trùng ngày đầu bố trí ở các nghiệm thức nằm trong khoảng từ  $(11,31 \pm 4,4 \text{ con/mL})$ , ở chu kỳ 1 nghiệm thức B7 + B41 thì mật độ luân trùng mang trứng cao nhất trung bình đạt  $46,89 \text{ con/mL}$ , số luân trùng cao nhất đạt  $143,12 \text{ con/mL}$  đạt 18,8%, hệ số trứng đạt 5,3%. Ở nghiệm thức ĐC trung bình đạt  $7,61 \text{ con/mL}$  chiếm tỷ lệ thấp nhất, hệ số trứng là 0,28%, nghiệm thức ĐC khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Chu kỳ 1

mật độ luân trùng mang trứng cao ở nghiệm thức B7 + B41 chứng tỏ luân trùng có sử dụng vi khuẩn, chu kỳ hai thấy rõ được mật độ luân trùng mang trứng ở nghiệm thức ĐC thấp nhất, ở chu kỳ 2 và 3 mật độ luân trùng mang trứng cũng tăng cao ở nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn và chế phẩm vi sinh so với nghiệm thức ĐC. Do môi trường nước có lượng thức ăn dư thừa cùng với mật độ trứng tăng nên tỷ lệ luân trùng mang trứng giảm vào cuối mỗi chu kỳ nuôi. Điều này chứng tỏ mật độ mang trứng của luân trùng phụ thuộc rất nhiều vào môi trường và thức ăn.



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

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

Sau khi kết thúc thí nghiệm 1, sử dụng luân trùng được nuôi với vi khuẩn *Bacillus* để gây cảm nhiễm với *Vibrio harveyi*, mật độ trung bình là  $19 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ . Qua Bảng 1 cho thấy sau 6 ngày

bổ sung vi khuẩn thì mật độ *Vibrio* giảm đáng kể trung bình chỉ còn  $0,7 \times 10^3 \text{ CFU/mL}$ , quần thể luân trùng cũng giảm. Theo Moriarty (1999) trích bởi Ngô Thị Huyền (2011), mật độ vi khuẩn *Vibrio* vượt quá  $10^3 \text{ CFU/mL}$  thì sẽ gây hại đến đối tượng nuôi, quần thể luân trùng ban đầu từ  $463,8 \text{ con/mL}$  giảm còn  $19,7 \text{ con/mL}$ .



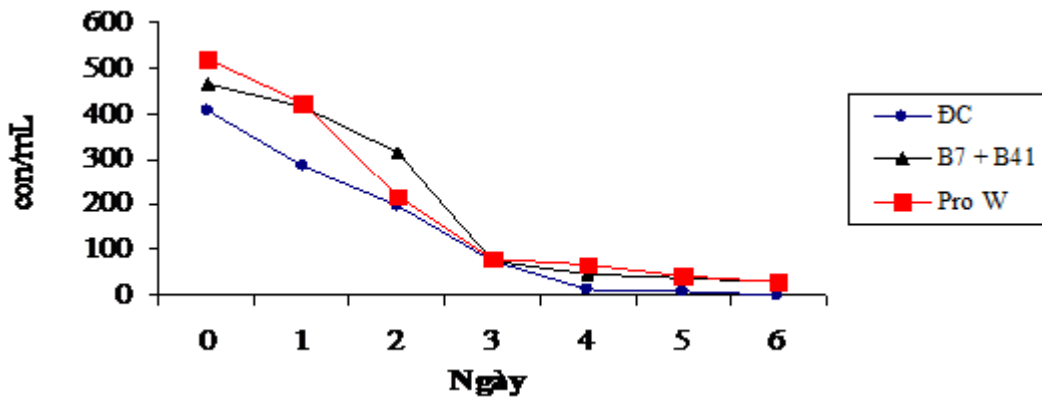
Tốc độ suy giảm của luân trùng nhanh nhất là ở nghiệm thức ĐC, luân trùng chết hoàn toàn ở ngày thứ 6 ở Hình 8, các nghiệm thức còn lại mật độ luân trùng cũng giảm rõ sau 6 ngày thí nghiệm. Đặc biệt là ở các nghiệm thức luân trùng có bổ sung *Bacillus* ở thí nghiệm trước, loại vi khuẩn có thể hạn chế sự phát triển của vi khuẩn có hại nên

có tác dụng duy trì mật độ luân trùng đồng thời kìm hãm sự phát triển của *Vibrio*. Các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê, do sau 16 ngày thí nghiệm nên quần thể luân trùng đã bắt đầu chậm gia tăng mật độ, nên khi gây thí nghiệm cảm nhiễm mật độ luân trùng sẽ mau suy tàn hơn.

**Bảng 1: Biến động mật độ vi khuẩn *Vibrio* trước và sau khi bổ sung**

Nghiệm thức	ĐC	B7 + B41	Pro W
Trước	$12 \times 10^7 \pm 11^a$	$27 \times 10^7 \pm 30^a$	$18 \times 10^7 \pm 51^a$
Sau	$1,5 \times 10^3 \pm 57,72^a$	$0,3 \times 10^3 \pm 103^b$	$0,4 \times 10^3 \pm 167,6^c$

Ghi chú: Các trị số trên cùng một hàng với ký tự giống nhau để chỉ sự sai biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0.05$ , Tukey HSD test)



**Hình 8: 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 bố trí ban đầu là 30 cá thể/mL với ba nghiệm thức thí nghiệm B7 + B41 (*Bacillus amyloliquefaciens*) thì mật độ luân trùng mang trứng trung bình đạt 46,89 con/mL cũng như mật độ luân trùng đạt 1.000,78 cá thể/mL, mật độ trung bình đạt 401,62 cá thể/mL cao hơn so với nghiệm thức ĐC và nghiệm thức Pro W. Mật độ vi khuẩn *Bacillus* dao động từ  $2,05 \times 10^3 - 27,95 \times 10^3$  CFU/mL, cao nhất ở nghiệm thức B7 + B41 có giá trị trung bình từ  $16,38 \times 10^3 \pm 8,16$  CFU/mL, nghiệm thức đối chứng thấp nhất có giá trị trung bình  $3,67 \times 10^3 \pm 3,07$  CFU/mL nên môi trường nuôi có bổ sung chế phẩm vi sinh hay vi khuẩn *Bacillus* thì năng suất nuôi luân trùng sẽ được nâng cao cũng như môi trường nước được cải thiện đáng kể. Vi khuẩn *Bacillus* có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio*, ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn và chế phẩm vi sinh dao động từ  $1,3 \times 10^2 - 72,6 \times 10^2$  CFU/mL, còn ở nghiệm thức đối chứng dao động từ  $4,3 \times 10^3 - 9,4 \times 10^3$  CFU/mL. Các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cũng như chế phẩm vi sinh thì

thấy mật độ *Vibrio* giảm dần về cuối thí nghiệm, môi trường được cải thiện nhờ bổ sung vi khuẩn cũng như chế phẩm vi sinh. 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 có nhiều hơn những nghiên cứu về sức sống cũng như khả năng tăng trưởng của luân trùng thông qua việc bổ sung vi khuẩn và chế phẩm vi sinh. Cần tìm hiểu sâu hơn về khả năng lọc của luân trùng đối với việc bổ sung vi khuẩn có lợi vào hệ thống nuôi. Nghiên cứu các thí nghiệm liên quan đến sự kiểm soát hệ vi sinh trong môi trường nuôi luân trùng nhằm chọn lọc giống luân trùng có chất lượng tốt hơn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. APHA, AWWA, WEF, 1995. Standard method for the examination of water and wastewater (19 th Edidtion). 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., 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.
5. 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.
6. Hino, Akinori và Masachika Maeda, 1991. Environmental Management for Masculture of Rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Rotifer and Microalgae Culture Systems* p127 – 133.
7. Lubzens, E., A. Tandker and G. Minkoff, 1987. Rotifer as food in aquaculture. *Hydrobiologia.* 186/187, pp: 387- 400.
8. Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in Penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358.
9. Moriarty, D. J. W., 1999. Disease control in shrimp Aquaculture with probiotic bacteria. *Biomanagement system Pty. Ltd.*, 315 Main road, Wellington point. Queensland 4160 Australia and Department of Chemical Engineering. The University of Queensland. Qld. 4072 Australia.
10. Nagata, W.D. 1989; J.N.C. Whyte. 1992. Effect of yeast and algal diets on the growth and biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller) in culture. *Aquaculture and fisheries management* 1992, 23p:13-21.
11. Nguyễn Lâm Dũng, 1983. Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp Hà Nội, 368 trang.
12. Nguyễn Thị Ngọc Tinh, Nguyen Ngọc Phuoc, K. Dierckens, P. Sorgeloos, P. Bossier, 2010. Gnotobiotically grown rotifer *Brachionos plicatilis* sensu strictu as a tool for evaluation of microbial function and nutritional value of different food types. *Aquaculture* 253: 421-432
13. 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.
14. 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
15. 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.
16. Rombaut, I.G, 2001. Control of microbial community in rotifer cultures (*Brachionus plicatilis*), PhD thesis.
17. Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatirativivorakul and P.Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, trang 301 – 313.
18. Snell, T.W. and K. Carrillo, 1984. Body size variation among strains of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 37, pp: 359-367.
19. Trần Sương 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.
20. Trần Thị Thanh Hiền, Trần Ngọc Hải, Nguyễn Văn Hòa, Trần Sương Ngọc, Nguyễn Thị Thanh Thảo, 2007. Bài giảng “Kỹ thuật nuôi thức ăn tự nhiên”.
21. Trần Công Bình, 2006. Nghiên cứu hệ thống nuôi luân trùng năng suất cao và ổn định thích hợp với điều kiện Việt Nam. Đề tài khoa học cấp bộ.
22. Trần Thị Thu Hiền, 2010. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* ứng dụng tạo chế phẩm sinh học để xử lý môi trường nuôi trồng thủy sản.