

## ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC LIỀU LƯỢNG CHẾ PHẨM SINH HỌC KHÁC NHAU ĐẾN MÔI TRƯỜNG VÀ SỰ PHÁT TRIỂN CỦA TẢO *CHAETOCEROS MUELLERI*

Ngô Thị Thu Thảo<sup>1</sup>

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

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/12/2012

Ngày chấp nhận: 20/06/2013

### Title:

Effects of probiotic supplementation on the environmental factors and development of *Chaetoceros muelleri*

### Từ khóa:

Chế phẩm sinh học, mật độ tảo, *Chaetoceros muelleri*

### Keywords:

Probiotic, algae density *Chaetoceros muelleri*

### ABSTRACT

*Algae Chaetoceros muelleri* was cultured by F/2 based solution and supplemented with different concentrations of probiotics based on *Bacillus* and *Lactobacillus* (0, 0.5, 0.75 and 1.0 mg/L). At supplemented concentration of 0.75 mg/L, algae could reach the highest density ( $86,56 \pm 0,95 \times 10^5$  cells/ml) after 7 days and maintained until 12 days of culture period, these results were significantly different from control or other probiotic supplemented concentrations ( $p < 0.05$ ). Probiotic supplementation into algae culture increased the total bacteria counts and also *Bacillus* but reduced the density of *Vibrio* from day 4 of culture period in algae medium ( $p < 0.05$ ). The findings from this study will be a useful tool in algae culture to prevent the pathogenic bacterium from live food to aquaculture species in hatchery.

### TÓM TẮT

Tảo khuê *Chaetoceros muelleri* được nuôi bằng môi trường cơ bản F/2 và bổ sung chế phẩm sinh học có chứa vi khuẩn *Bacillus* và *Lactobacillus* với các liều lượng khác nhau là 0; 0,5; 0,75 và 1,0 mg/L. Kết quả cho thấy khi bổ sung với hàm lượng 0,75 mg/L mật độ tảo đạt cao ( $86,56 \pm 0,95 \times 10^5$  tb/ml) và duy trì được trong 12 ngày, kết quả này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) khi so sánh với việc không bổ sung hoặc bổ sung chế phẩm sinh học với các hàm lượng khác. Khi bổ sung chế phẩm sinh học đã làm tăng mật độ vi khuẩn tổng và vi khuẩn *Bacillus* nhưng làm giảm đáng kể mật độ vi khuẩn *Vibrio* trong mẻ tảo nuôi từ ngày thứ 4 ( $p < 0,05$ ). Kết quả thí nghiệm có khả năng ứng dụng trong nuôi sinh khối tảo nhằm hạn chế vi khuẩn gây hại.

## 1 GIỚI THIỆU

Nhiều quần thể vi sinh vật cùng tồn tại trong cùng một hệ sinh thái thì sẽ có sự cạnh tranh về dinh dưỡng và năng lượng. Cạnh tranh trong giới vi sinh vật chủ yếu là xảy ra ở nhóm dị dưỡng như cạnh tranh các chất hữu cơ mà chủ yếu nguồn carbon và năng lượng. Rico-Mora *et al.* (1998) đã cấy một dòng vi

khẩn được chọn lọc có khả năng phát triển trên môi trường nghèo hữu cơ vào bể nuôi tảo khuê cùng với *Vibrio alginolyticus* thì vi khuẩn *Vibrio* không phát triển. Điều đó chứng tỏ vi khuẩn được chọn lọc cạnh tranh lấn át *Vibrio* trong điều kiện nghèo hữu cơ. Những dòng vi khuẩn này có thể không tốt đối với ương ấu trùng bằng nước xanh, tuy nhiên sẽ có

lợi khi tảo phát triển quá mức trong ao nuôi. Nghiên cứu của Xiang-Hong *et al.* (1998) cũng cho thấy một số vi khuẩn hữu ích có thể kích thích hoặc ức chế sự phát triển của tảo. Tác giả còn cho biết thêm những vi khuẩn có lợi trong nước sẽ loại trừ nhanh NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, vật chất hữu cơ có hại. Ngoài ra, chúng còn có thể cân bằng pH trong ao nuôi.

Trên thế giới, tảo khuê *Chaetoceros* sp được sử dụng rộng rãi làm thức ăn trong các trại sản xuất giống giáp xác và động vật thân mềm (*Hemaiswarya et al.*, 2011). Quá trình nuôi sinh khối tảo sẽ không tránh khỏi sự lây nhiễm vi khuẩn gây hại từ nguồn nước, dụng cụ nuôi và không khí... Hạn chế quá trình lây nhiễm này bằng việc phát triển mối quan hệ cạnh tranh giữa nhóm vi khuẩn hữu ích và vi khuẩn gây hại sẽ góp phần nâng cao tính an toàn và chất lượng của sinh khối tảo phục cho việc sản xuất giống các đối tượng thủy sản đạt hiệu quả cao hơn.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Các nghiệm thức bố trí

Thí nghiệm được thực hiện trên tảo khuê *Chaetoceros muelleri*, với 4 liều lượng chế phẩm sinh học (CPSH) được bổ sung vào môi trường nuôi tảo là: 1). Đối chứng: Không bổ sung CPSH; 2). Bổ sung CPSH với liều lượng 0,5 mg/L nước tảo nuôi; 3). Bổ sung CPSH với liều lượng 0,75 mg/L và 4). Bổ sung CPSH với liều lượng 1,0 mg/L.

Các yếu tố môi trường (pH, TAN và NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) được kiểm tra sau mỗi 3 ngày, mật độ tảo được xác định hàng ngày và mật độ vi khuẩn *Bacillus*, *Vibrio*, vi khuẩn tổng được kiểm tra sau mỗi 2 ngày.

Thành phần CPSH Tado-*Bacillus* có chứa *Bacillus subtilis* (1,5×10<sup>9</sup> CFU), *Lactobacillus acidophilus* (1,5×10<sup>9</sup> CFU), các loại men như Protease (16000 UI), Amylase (4000 UI).

### 2.2 Cách nuôi cấy và xác định mật độ tảo

Tảo khuê *Chaetoceros muelleri* được nuôi bằng môi trường cơ bản F/2 trong các bình thủy tinh có thể tích 8 lít có gắn sục khí. Các

bình nuôi tảo được đặt trong phòng có máy điều hòa nhiệt độ giữ ổn định ở 26°C và cường độ ánh sáng là 5400 lux. Tảo *C. muelleri* thuần được đặt mua từ trường Đại học Nha Trang và mật độ nuôi ban đầu là 5 × 10<sup>5</sup> tb/mL.

Mật độ tảo được xác định hàng ngày bằng cách sử dụng buồng đếm Improved Neubauer và công thức tính là: N (tb/ml) = (n/64) × 10<sup>4</sup>. Trong đó: n là tổng số tế bào đếm được trong 64 ô nhỏ của buồng đếm.

### 2.3 Xác định mật độ vi khuẩn

Chuẩn bị các ống nghiệm chứa nước muối sinh lý (0,85%) được tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút. Lấy 1 ml mẫu nước cần xác định cho vào ống nghiệm chứa nước muối sinh lý, trộn đều được nồng độ pha loãng 10<sup>-1</sup>. Tiếp tục lấy 1 ml nước ở nồng độ 10<sup>-1</sup> cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý và trộn đều, được nồng độ pha loãng 10<sup>-2</sup>. Các bước tiếp theo tương tự sẽ được nồng độ pha loãng cần thiết.

Đối với mẫu xác định mật độ vi khuẩn *Bacillus*, sau khi pha loãng được nồng độ thích hợp đem sấy ở nhiệt độ 80°C trong 20 phút.

Cách lấy mẫu vào môi trường thạch: Dùng Micropipete hút 100 μL dung dịch trong ống nghiệm chứa vi khuẩn cho vào đĩa chứa môi trường chuyên biệt rồi dùng que tán đều đến khi khô hoàn toàn. Các đĩa sau khi tán đều được đem ủ trong tủ 28°C và kiểm tra sau 24 giờ. Số vi khuẩn được tính theo công thức:

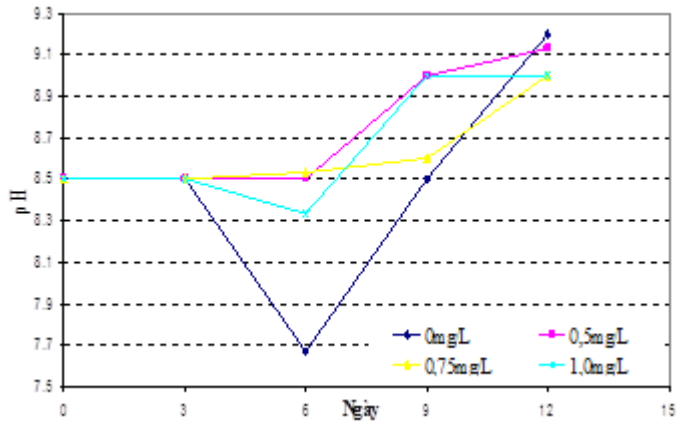
Đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU/ml) = số khuẩn lạc × độ pha loãng × 10.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Các yếu tố môi trường

Kết quả cho thấy 3 nghiệm thức được bổ sung CPSH có giá trị pH ổn định trong suốt chu kỳ phát triển của tảo. Tuy nhiên, pH ở nghiệm thức bổ sung 0,75 mg/L là ổn định nhất và nghiệm thức đối chứng có pH biến động nhiều nhất (Hình 1). Xiang-Hong *et al.* (1998) nghiên cứu và báo cáo rằng một số vi khuẩn hữu ích có thể cân bằng pH trong ao nuôi.

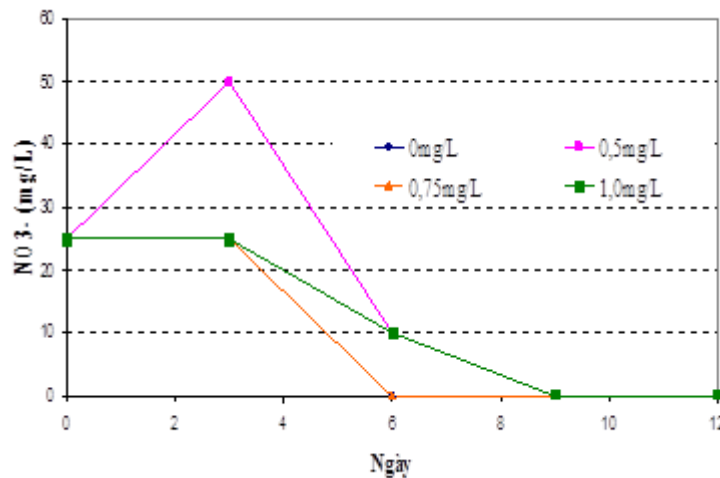
**Hình 1: Biến động giá trị pH trong các nghiệm thức theo thời gian**



Trong các nghiệm thức đều không xác định được hàm lượng TAN, có thể TAN đã được tảo hấp thu hoặc cũng có thể đã được chuyển hóa thành  $\text{NO}_3^-$ .  $\text{NH}_4^+$  trong nước rất cần thiết cho sự phát triển của các sinh vật làm thức ăn tự nhiên, nhưng nếu hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  quá cao sẽ làm cho thực vật phù du phát triển quá mức không có lợi cho các đối tượng thủy sản.

Hàm lượng nitrat giảm nhanh ở các liều lượng CPSH bổ sung là 0 và 0,75 mg/L. Tuy nhiên, khi ta bổ sung 0,5 mg/L vào ngày thứ 3 thì hàm lượng nitrat tăng so với ban đầu (50 mg/L), có khả năng vi khuẩn chuyển hóa đạm phát triển nhanh hơn và quá trình chuyển hóa đạm diễn ra nhanh hơn các nghiệm thức khác (Hình 2).

**Hình 2: Biến động hàm lượng  $\text{NO}_3^-$  (mg/L) trong các nghiệm thức**



### 3.2 Biến động mật độ tảo theo thời gian

Với mật độ ban đầu là  $5 \times 10^5$  tb/mL, việc bổ sung CPSH vào môi trường nuôi làm cho tảo *C. muelleri* đạt mật độ cao hơn và có thể duy trì trong 12 ngày (Bảng 1 và Hình 3). Nghiệm thức bổ sung 0,75 mg/L có mật độ tảo đạt cực đại vào ngày thứ 7 ( $86,56 \pm 0,95 \times 10^5$  tb/mL) và khác biệt thống kê so với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Mai và ctv (2009) cho

rằng mật độ tảo *C. calcitrans* đạt cao nhất là  $21 \times 10^5$  tb/mL trong thời gian 6 ngày nuôi trong môi trường TT3 với mật độ ban đầu là  $6 \times 10^5$  tb/mL. Có khả năng tảo *C. muelleri* có kích thước nhỏ hơn, quá trình phân chia tế bào sẽ xảy ra với tốc độ nhanh hơn. Tuy nhiên, kết quả của thí nghiệm bổ sung CPSH vào môi trường nuôi tảo *C. muelleri* cho thấy thời gian đạt mật độ cực đại chậm hơn nhưng sự phát triển của tảo được duy trì lâu hơn. Đây có thể

là một trong những ứng dụng nhằm điều tiết và duy trì quá trình nuôi sinh khối tảo trong các trại sản xuất giống. Grossart *et al.* (2006) thí nghiệm trên 2 loài tảo khuê *Skeletonema costatum* và *Thalassiosira rotula* bằng nước biển tiệt trùng và nước biển có chứa quần thể vi khuẩn tự nhiên cũng quan sát thấy sự phát

triển của tảo trong môi trường có vi khuẩn sẽ chậm hơn nhưng diễn ra trong thời gian kéo dài hơn. Các tác giả nhấn mạnh vai trò của vi khuẩn dị dưỡng trong việc kiểm soát sự phát triển và kết lắng của tảo trong môi trường nước biển.

**Bảng 1: Biến động mật độ tảo trung bình theo thời gian ( $10^5$  tb/mL)**

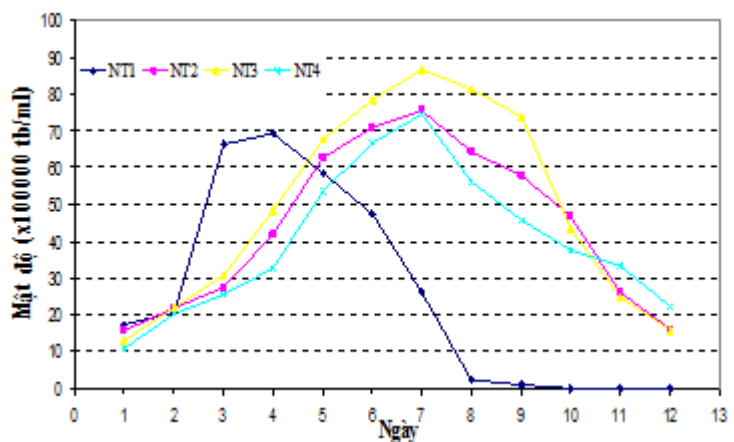
Ngày	Liều lượng CPSH bổ sung (mg/L)			
	0	0,5	0,75	1,0
1	17,40±0,36 <sup>d</sup>	15,53±0,32 <sup>c</sup>	12,98±0,42 <sup>b</sup>	10,94±0,54 <sup>a</sup>
2	20,44±0,35 <sup>ab</sup>	22,06±1,15 <sup>b</sup>	21,79±0,32 <sup>ab</sup>	20,28±0,13 <sup>a</sup>
3	66,37±0,88 <sup>c</sup>	27,42±0,85 <sup>a</sup>	30,84±0,57 <sup>b</sup>	25,52±0,87 <sup>a</sup>
4	69,32±0,87 <sup>d</sup>	41,77±0,73 <sup>b</sup>	48,46±1,04 <sup>c</sup>	32,76±1,48 <sup>d</sup>
5	58,51±0,87 <sup>b</sup>	62,88±0,81 <sup>c</sup>	67,78±2,00 <sup>d</sup>	53,44±1,07 <sup>a</sup>
6	47,44±0,92 <sup>a</sup>	71,00±0,63 <sup>c</sup>	78,41±0,92 <sup>d</sup>	66,76±1,48 <sup>b</sup>
7	26,14±0,67 <sup>a</sup>	75,44±0,88 <sup>ab</sup>	86,56±0,95 <sup>c</sup>	74,48±2,03 <sup>ab</sup>
8	2,42±0,07 <sup>a</sup>	64,40±1,02 <sup>c</sup>	81,38±0,97 <sup>d</sup>	56,17±2,03 <sup>b</sup>
9	0,88±0,03 <sup>a</sup>	57,89±1,52 <sup>c</sup>	73,76±1,49 <sup>d</sup>	45,79±3,19 <sup>b</sup>
10	0,14±0,02 <sup>a</sup>	46,87±0,58 <sup>d</sup>	43,43±1,90 <sup>c</sup>	37,61±1,05 <sup>b</sup>
11	0,00±0,00 <sup>a</sup>	26,23±0,55 <sup>ab</sup>	24,80±1,95 <sup>ab</sup>	33,36±2,60 <sup>c</sup>
12	0,00±0,00 <sup>a</sup>	15,89±0,48 <sup>bc</sup>	15,54±2,04 <sup>b</sup>	22,10±4,41 <sup>c</sup>

Các số liệu cùng một hàng có chữ cái khác nhau thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Khi được bổ sung hàm lượng CPSH là 1,0 mg/L thì mật độ tảo ở nghiệm thức này đạt thấp so với bổ sung 0,75 mg/L và kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Nghiên cứu của Xiang-Hong *et al.* (1998) cho thấy một số vi khuẩn hữu ích có thể kích thích hoặc ức chế sự phát triển của tảo. Sử dụng CPSH với liều

lượng 1 mg/L có thể đã làm cản trở quá trình tiếp nhận ánh sáng và trao đổi chất của tảo khi chúng bám vào tảo như giá thể. Ngoài ra, thành phần của CPSH còn chứa vi khuẩn *Lactobacillus* và một số men làm tăng khả năng tiêu hóa do đó có thể đã ức chế sự phân chia tế bào tảo.

**Hình 3: Biến động mật độ tảo ( $10^5$ tb/mL) theo thời gian**



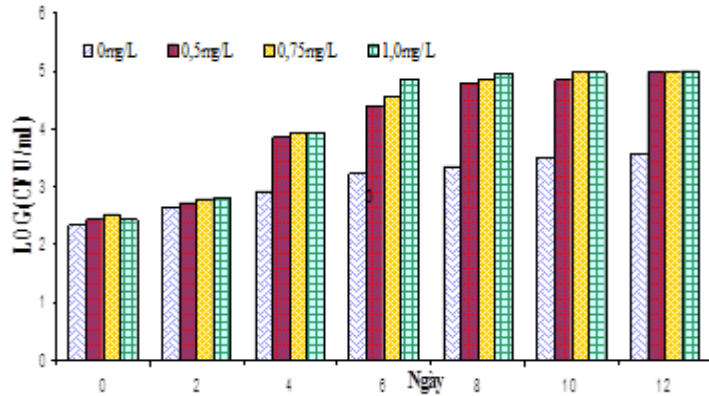
### 3.3 Biến động mật độ vi khuẩn trong môi trường nuôi tảo

#### 3.3.1 Mật độ vi khuẩn tổng trong nước (CFU/mL)

Các nghiệm thức bổ sung CPSH có mật độ vi khuẩn tổng tăng từ  $2,75 \times 10^2$  -  $9,8 \times 10^4$  CFU/mL. Từ ngày thứ 8 - 12 mật độ vi

khẩn tổng của 3 nghiệm thức bổ sung CPSH tăng không đáng kể nhưng cao hơn so với không bổ sung CPSH (Hình 4). Ngô Thị Thu Thảo *et al.* (2012) thử nghiệm các phương pháp bổ sung CPSH vào môi trường ương nghêu cũng làm cho mật độ vi khuẩn tổng tăng lên đáng kể (từ  $4,8 \times 10^4$  -  $6,4 \times 10^6$  CFU/mL).

Hình 4: Biến động mật độ vi khuẩn tổng cộng

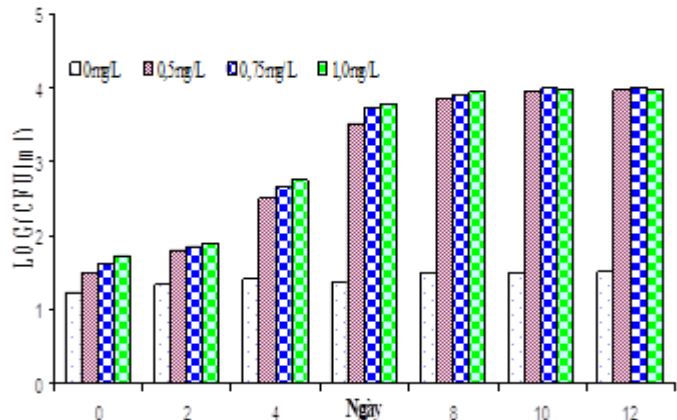


#### 3.3.2 Mật độ vi khuẩn *Bacillus subtilis* trong nước (CFU/ml)

Trong các nghiệm thức bổ sung CPSH, mật độ *B. subtilis* bắt đầu tăng vào ngày thứ 4 đến ngày thứ 6 ( $6,1 \times 10^3$  CFU/mL) và dường như không tăng thêm từ ngày thứ 8-12 của quá trình nuôi tảo (Hình 5). Nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân và Trương Quốc Phú (2011) cho thấy vi khuẩn *Bacillus* phát triển vào ngày thứ 5-7 khi được bổ sung vào môi trường ương tôm sú. Mật độ vi khuẩn *B. subtilis* không khác biệt giữa các nghiệm thức được bổ sung CPSH

tuy nhiên rất khác biệt so với nghiệm thức đối chứng ( $p < 0,05$ ). Điều đó chứng tỏ trong môi trường nuôi sinh khối tảo, vi khuẩn *Bacillus* đã phát triển tốt và không loại trừ khả năng nhóm vi khuẩn này đã sử dụng tảo *C. muelleri* làm giá thể phục vụ cho sự phát triển của chúng. Nghiên cứu của Grossart *et al.* (2006) cho thấy mật độ vi khuẩn dính trên tảo khuê *S. costatum* và *T. rotula* chỉ tăng nhẹ vào ngày 9 và ngày 11 khi mật độ tảo giảm xuống. Các tác giả cho rằng vi khuẩn đã mở rộng xâm nhập và phát triển trên những tế bào tảo đã hóa già.

Hình 5: Biến động mật độ *B. subtilis* theo thời gian trong các nghiệm thức



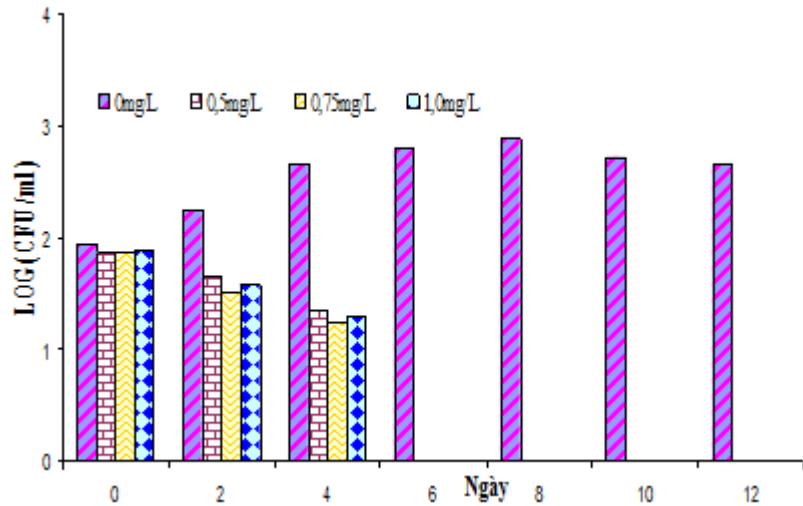


### 3.3.3 Mật độ *Vibrio* trong nước (CFU/mL)

Trong các nghiệm thức bổ sung CPSH thì mật độ *Vibrio* rất thấp và đến ngày thứ 6 thì nhóm vi khuẩn này không còn xuất hiện (Hình 6). Sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus* từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 7 có thể đã lấn át sự phát triển của nhóm *Vibrio*. Trong nghiệm

thức không bổ sung CPSH thì mật độ *Vibrio* càng tăng về cuối chu kỳ nuôi tảo, sau ngày nuôi thứ 4 thì mật độ *Vibrio* tăng rất nhanh từ  $8,75 \times 10^1$  đến  $7,75 \times 10^2$  CFU/mL, đạt cao nhất vào ngày thứ 8 và cao hơn so với các nghiệm thức khác ( $p < 0,05$ ).

**Hình 6: Biến động mật độ vi khuẩn *Vibrio* theo thời gian (CFU/mL)**



Các loài vi khuẩn *Bacillus* có khoảng biến động lớn về khả năng ức chế vi sinh vật. Các nghiên cứu trước đây cho thấy một số loài vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng chống lại vi khuẩn Gram âm và Gram dương (Yilamz *et al.*, 2006). Rengpipat *et al.* (1998) báo cáo về loài vi khuẩn *Bacillus* S11 phân lập từ tôm sú khô mạnh có khả năng giảm tỷ lệ tử vong khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn phát sáng *V. harveyi*. Ngô Thị Thu Thảo và Phạm Thị Tuyết Ngân (2011) khi bổ sung dòng *Bacillus* B37 vào bể ương ốc hương đã hạn chế sự phát triển và làm cho mật độ vi khuẩn *Vibrio* đạt thấp nhất trong tất cả các nghiệm thức thí nghiệm (10 - 80 CFU/ml). Kết quả bổ sung CPSH vào tảo nuôi đã có tác dụng hạn chế sự phát triển của nhóm vi khuẩn *Vibrio* như vậy sẽ có ý nghĩa trong việc phòng bệnh do vi khuẩn lây nhiễm từ nguồn thức ăn tự nhiên.

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1 Kết luận

Việc bổ sung chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn *Bacillus* với hàm lượng 0,75 mg/L vào tảo *Chaetoceros muelleri* đã đạt được mật độ

tảo cao nhất ( $86,56 \pm 0,95 \times 10^5$  tb/mL) và duy trì môi trường ổn định sau 12 ngày nuôi.

Bổ sung chế phẩm sinh học vào môi trường nuôi tảo đã góp phần ổn định môi trường và hạn chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio*.

### 4.2 Đề xuất

Kết hợp bổ sung CPSH vào tảo và trực tiếp vào môi trường nhằm hạn chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio* và nâng cao tỷ lệ sống các đối tượng thủy sản được ương nuôi.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Grossart, H.P., Czub G. and Simon M. 2006. Algae–bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environmental Microbiology* 8 (6): Pages 1074–1084.
- Hemaiswarya S., Raja R., Ravi Kumar R., Ganesan V., Anbazhagan C.. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol* 27: Pages 1737–1746.
- Ngô Thị Thu Thảo và Phạm Thị Tuyết Ngân. 2011. Ảnh hưởng của việc bổ sung các loại chế

- phẩm sinh học chứa vi khuẩn *Bacillus* trong quá trình ương ấu trùng ốc hương (*Babylonia areolata*). Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Thủy sản lần 4. Trường Đại học Cần Thơ, ngày 26/1/2011. Nhà Xuất bản Nông nghiệp. Trang 55-64.
4. Ngô Thị Thu Thảo, Đào Thị Mỹ Dung và Võ Minh Thế. 2012. Ảnh hưởng của việc bổ sung chế phẩm sinh học đến sinh trưởng và tỷ lệ sống của nghêu (*Meretrix lyrata*) giai đoạn giống. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ số 21b/2012. ISSN: 1859-2333. Trang 97-107.
  5. Nguyễn Thị Thanh Mai, Trịnh Hoàng Khải, Đào Văn Trí, Nguyễn Văn Hùng. 2009. Nghiên cứu phân lập, nuôi cấy in vitro tảo silic nước mặn *Chaetoceros calcitrans* Paulsen, 1905 và ứng dụng sinh khối tảo làm thức ăn cho tôm he chân trắng (*Penaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập 12, số 13. Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
  6. Phạm Thị Tuyết Ngân và Trương Quốc Phú. 2011. Ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus* (B8, B37 và B18) lên chất lượng nước bể tôm sú. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Thủy sản lần 4. Trường Đại học Cần Thơ. Nhà Xuất bản Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh: Trang 28-41.
  7. Rengpipat S., Phianphak W., Piyativatitivorahul S. and Menasveta P., 1998. Effect of probiotics on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture 167: Pages 301-313.
  8. Rico-Mora R, Voltolina D, Villaescusa-Celaya JA, 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). Aquacult. Eng. 19: Pages 1–6.
  9. Xiang-Hong W. et al. 1998. Application of probiotics in aquaculture. <http://www.alkenmurray.com/China98.htm>, 4 pp.
  10. Yilmaz M., 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. Microbiol Res 161: Page 5.