



ẢNH HƯỞNG KẾT HỢP CỦA ĐỘ MẶN VÀ VIỆC BỔ SUNG VI KHUẨN *Bacillus subtilis* ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ SINH SẢN CỦA *Artemia franciscana*

Ngô Thị Thu Thảo¹, Phạm Thị Tuyết Ngân¹ và Nguyễn Thị Bảo Trang¹

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 15/12/2014

Ngày chấp nhận: 19/08/2015

Title:

Combined effects of salinity and *Bacillus subtilis* supplementation on the growth and reproduction of *Artemia franciscana*

Từ khóa:

Bacillus subtilis, độ mặn, *Artemia franciscana*, chiều dài, sức sinh sản

Keywords:

Bacillus subtilis, salinity, *Artemia franciscana*, length, fecundity

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of salinity on the development and the contributions of *Bacillus subtilis* on growth and reproduction of *Artemia franciscana* Vinh Chau. Experiment was set up with 6 treatments and was run triplicates per each treatment with two factorial design, in which salinity (30, 70 and 90‰) combined the supplementation or without *B. subtilis* into *Artemia* culture medium. *Artemia* were cultured at the density of 500 ind./L and were fed by commercial feed No.0 for nursing tiger shrimp. After 15 days, *Artemia* obtained highest survival rate (61.5%) at 90‰ with *B. subtilis* supplementation. *Artemia* in this treatment also reached highest values in length (8.35 mm), mating rate (51.3%) and fecundity (45 offspring/female), these results was significant difference from other treatments ($p < 0.05$). Our findings also showed that *B. subtilis* can survive, develop and play a positive role in growth and reproduction of *Artemia* in culture medium at the salinity of 90‰.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của độ mặn đến sự phát triển và tác dụng của vi khuẩn *Bacillus subtilis* đến sinh trưởng và sinh sản của *Artemia franciscana* đồng Vĩnh Châu. Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần và được bố trí theo 2 nhân tố là độ mặn (30, 70 và 90‰) kết hợp với bổ sung hoặc không bổ sung *B. subtilis* vào môi trường nuôi *Artemia*. *Artemia* được nuôi với mật độ 500 con/L và cho ăn bằng thức ăn tôm sú số 0. Sau 15 ngày nuôi, tỉ lệ sống của *Artemia* cao nhất (61,5%) ở nghiệm thức 90‰ có bổ sung chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn *B. subtilis* và cũng ở nghiệm thức này thì chiều dài (8,35 mm), tỉ lệ bắt cặp (51,3%) và sức sinh sản (45 phôi/con cái) đều đạt cao nhất và khác biệt so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$). Kết quả thí nghiệm còn cho thấy vi khuẩn *B. subtilis* có thể tồn tại, phát triển, góp phần cải thiện môi trường nuôi, sinh trưởng và sinh sản của *Artemia* ở độ mặn 90‰.

1 GIỚI THIỆU

Artemia là nguồn thức ăn có giá trị dinh dưỡng cao, đóng vai trò rất quan trọng trong ngành nuôi

trồng thủy sản (Wache & Laufer, 1997). Ấu trùng *Artemia* là loại thức ăn không thể thay thế trong quá trình ương nuôi ấu trùng tôm cá. Vì vậy, *Artemia* đã và đang trở thành một trong những đối

trượng rất được quan tâm, mang lại lợi nhuận và hiệu quả kinh tế cho người nuôi.

Đối với *Artemia* thì việc bổ sung chế phẩm sinh học (CPSH) đã đem lại nhiều hiệu quả tích cực, nhiều dòng vi khuẩn được phân lập và có tác dụng tăng năng suất nuôi *Artemia* sinh khối. Những vi khuẩn này giúp *Artemia* kháng lại vi khuẩn gây bệnh hoặc ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh (Verschere *et al.*, 1999; Gomez-Gil *et al.*, 1998 được trích dẫn bởi Phạm Thị Tuyết Ngân, 2011). Nhóm vi khuẩn *Bacillus* cũng giúp cải thiện sự phát triển của ấu trùng *Artemia* kháng lại vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* (Abdelkarim *et al.*, 2010). *V. alginolyticus* là vi khuẩn gây bệnh trên các đối tượng nước mặn bao gồm cá, giáp xác và động vật thân mềm (Balebona *et al.*, 1998; Ben kahla-Nakbi *et al.*, 2006 và Luna-González *et al.*, 2002). Trong một nghiên cứu của Rengpipat *et al.* (1998), *Artemia* được giàu hóa bằng *Bacillus* dòng S11 giúp làm tăng chiều dài và trọng lượng thân của tôm sú (*Penaeus monodon*). Trong hai tuần nuôi, tỉ lệ sống của tôm khác nhau đáng kể giữa nhóm có sử dụng *Bacillus* (89%) so với đối chứng (85%). Bên cạnh đó, khi gây cảm nhiễm bởi vi khuẩn *Vibrio harveyi*, tôm ở nghiệm thức có bổ sung *Bacillus* đạt tỉ lệ sống cao hơn (13%) so với đối chứng (4%).

Artemia là loài rộng muối sống được trong nước lợ từ vài phần nghìn đến nước mặn bão hòa. Tuy nhiên, trong thực tế việc nuôi *Artemia* để thu sinh khối hoặc trứng bào xác thường được tiến hành ở độ mặn cao (80-120 ‰) vì có thể hạn chế các nhóm địch hại ăn mồi hoặc các nhóm sinh vật ăn lọc cạnh tranh thức ăn khác. Trong hệ thống nuôi *Artemia*, thức ăn cho loài giáp xác này chủ yếu dựa vào việc bón phân gây màu tảo trực tiếp trong ao nuôi hoặc gián tiếp từ ao bón phân. Gần đây, thức ăn tôm sú và thức ăn chuyên biệt được sử dụng trực tiếp nhằm cung cấp thức ăn cho *Artemia* nuôi thâm canh. Bên cạnh tảo, thức ăn công nghiệp thì nhóm vi khuẩn hữu ích trong đó có *Bacillus* cũng là nguồn thức ăn thích hợp trong ao nuôi *Artemia* do đặc điểm ăn lọc không chọn lọc của loài giáp xác này. Hiện nay, chưa có nhiều nghiên cứu về sự tồn tại và phát triển của vi khuẩn *Bacillus* trong điều kiện độ mặn cao và đánh giá hiệu quả của việc bổ sung chế phẩm sinh học vào môi trường nuôi *Artemia*. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng kết hợp của độ mặn và vi khuẩn *Bacillus subtilis* đến sinh trưởng và sinh sản của *Artemia franciscana*. Kết quả thu được sẽ đóng góp những cơ sở bước đầu về việc ứng dụng chế phẩm sinh học trong nghề nuôi

Artemia, với mục tiêu góp phần cải thiện môi trường và năng suất *Artemia*.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Artemia được nuôi ở các độ mặn là 30, 70 và 90 ‰; mỗi độ mặn thí nghiệm được bổ sung hoặc không bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* (đối chứng). Thí nghiệm được bố trí 2 nhân tố gồm 6 nghiệm thức và mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần (Bảng 1).

Bảng 1: Cách bố trí các nghiệm thức thí nghiệm

Vi khuẩn <i>B. subtilis</i>	Các độ mặn thí nghiệm (%)		
	30	70	90
Không bổ sung	NT1	NT3	NT5
Bổ sung	NT2	NT4	NT6

Artemia franciscana ấp nở sau 24 giờ được bố trí vào các keo thủy tinh có thể tích 4 Lít với mật độ là 500 con/Lít. Hệ thống đèn được lắp đặt, chiếu sáng và sục khí liên tục, nhiệt độ được duy trì ổn định 27°C trong quá trình thí nghiệm.

Hàng ngày, *Artemia* được cho ăn 2 lần (7 giờ và 17 giờ) theo khẩu phần ăn tiêu chuẩn (Nguyễn Văn Hòa, 1993). Thức ăn công nghiệp dạng bột mịn được rây qua lưới 50 µm sau đó cân khối lượng và hòa tan vào thể tích nước biển tương ứng có độ mặn giống như các nghiệm thức thí nghiệm. Trước khi cho ăn, dung dịch thức ăn được lắc đều và sử dụng micropipet (thể tích 200-1000 µl) để lấy thức ăn đã pha sẵn cho vào keo nuôi *Artemia*. Trong ngày đầu tiên của thí nghiệm, thức ăn được cho ăn với liều lượng 0,42 mL/ngày; ngày thứ 2 đến ngày 4 cho ăn 0,83 mL/ngày. Lượng thức ăn được tăng lên từ ngày 5 và 6 (1,25 mL/ngày) đến ngày 10 (4 mL/ngày). Sau đó định kỳ cách 2 ngày thì tăng 1 mL đến ngày nuôi thứ 18 và 19 là 8,5 mL/ngày. Kể từ ngày 20 trở đi, liều lượng cho ăn mỗi ngày là 10 mL.

Chế phẩm sinh học thương mại có thành phần chính là *Bacillus subtilis* với mật độ từ 10⁷ – 10⁸ CFU/g. Liều lượng chế phẩm sinh học bổ sung là 150 mg/L và bổ sung theo định kỳ 5 ngày/lần. Chế phẩm được hòa tan vào từng độ mặn tương ứng, được sục khí liên tục trong 2 - 3 giờ sau đó đóng thể tích bằng nhau để bổ sung vào các keo nuôi *Artemia*.

2.1.1 Các chỉ tiêu theo dõi

Chỉ tiêu về môi trường

Các yếu tố môi trường như: pH, độ kiềm, nitrite, ammonia được kiểm tra sau mỗi 5 ngày bằng phương pháp so màu (sử dụng bộ test SERA,

sản xuất tại Đức). Mật độ vi khuẩn *B. subtilis* được thu định kỳ vào ngày 1, 5, 10 và 15 trong quá trình nuôi ở các nghiệm thức được bổ sung.

Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn *B. subtilis*

Các ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý (0,85%) được tiệt trùng ở 120°C trong 20 phút. Thực hiện thao tác pha loãng, sau khi pha loãng đến nồng độ thích hợp mẫu được đem ủ ở 80°C trong 20 phút rồi lấy các ống nghiệm ra. Sau đó dùng micropipete hút 100µL dung dịch huyền phù vi khuẩn cho vào các đĩa chứa môi trường chuyên biệt cho giống *Bacillus*, dùng que thủy tinh tán đều đến khi mẫu khô và mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Các đĩa được đem ủ ở 28°C trong 24 - 48 giờ, sau đó đem ra đọc kết quả. Số khuẩn lạc tổng cộng được đếm trên những đĩa petri có số khuẩn lạc >20 và <200. Số lượng vi khuẩn được tính theo công thức:

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

Chỉ tiêu về sinh trưởng và sinh sản của *Artemia*

Chiều dài của *Artemia* được thu vào ngày nuôi đầu tiên và các ngày 5, 10, 15 trong quá trình thí nghiệm. Kích thước được tính từ đỉnh đầu đến tận cùng của đuôi dưới kính lúp có gắn trục vi thị kính. Tỷ lệ sống được xác định bằng cách thu số con còn sống ở mỗi keo vào ngày nuôi thứ 5, 10, 15.

Tỷ lệ sống (%) = (số con thu được × 100)/số con bố trí

Chiều dài của *Artemia* khi tham gia sinh sản được xác định bằng cách thu 10 con đực và 10 con cái ở từng nghiệm thức, sau đó tiến hành đo kích thước.

Tỷ lệ bắt cặp = (số cặp/số *Artemia* thả ban đầu) × 100

Sau khi *Artemia* bắt cặp, bắt 20-30 con cái/nghiệm thức, mở túi ấp của từng con để xác định phương thức sinh sản và số phôi. Quá trình thu mẫu được tiến hành 3 lần liên tục, mỗi lần cách nhau 3 ngày.

Số phôi/con cái: số trứng bào xác và con Nauplius được sinh ra bởi con cái.

2.1.2 Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Excel để tính toán các giá

trị trung bình, độ lệch chuẩn và phương pháp phân tích ANOVA 2 nhân tố trong chương trình SPSS 16.0 để đánh giá sự khác biệt giữa các giá trị trung bình của các nghiệm thức với kiểm định Duncan ở độ tin cậy $p < 0,05$.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Biến động các yếu tố môi trường

Nhiệt độ, pH và độ kiềm

Nhiệt độ được duy trì ở 27°C, nhìn chung ở nhiệt độ này là thích hợp cho *Artemia*. Nhiệt độ là một trong những yếu tố môi trường ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và sinh sản của *Artemia*. Theo Nguyễn Văn Hòa *et al.* (2005) thì nhiệt độ quá thấp ($\leq 20^\circ\text{C}$) *Artemia* sẽ sinh trưởng chậm hoặc chết rải rác và ngược lại nhiệt độ quá cao ($> 36^\circ\text{C}$) gây ra hiện tượng chết, có khi chết hàng loạt, giảm khả năng sinh sản và quần thể phục hồi rất chậm. Đối với *Artemia franciscana* dòng Vĩnh Châu chúng có thể phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ từ 22-35°C.

pH trong các nghiệm thức dao động ở khoảng 8,2-8,3. Theo Browne *et al.* (1991) pH thích hợp để ấu trùng *Artemia* phát triển tốt là 7- 8,5. Theo Nguyễn Văn Hòa *et al.* (2007), *Artemia* Vĩnh Châu phát triển tốt trong điều kiện pH từ 7-9. Do đó, khoảng pH trên phù hợp cho *Artemia* trong quá trình thí nghiệm.

Độ kiềm trong nước dao động từ 142,4-160,2 mgCaCO₃/L. Wurts và Durborow (1992) nhận định môi trường có độ kiềm thấp pH dễ bị biến động hơn so với khi độ kiềm cao, độ kiềm cao thì khả năng đệm tốt giúp pH ao nuôi ít biến động theo ngày đêm.

Hàm lượng NH₄⁺ (mg/L)

Trong quá trình nuôi thì hàm lượng NH₄⁺ ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* thấp hơn so với đối chứng (Bảng 2). Tác dụng cải thiện môi trường của nhóm vi khuẩn *Bacillus* đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu khác nhau trên các đối tượng thủy sản. Phạm Thị Tuyết Ngân và Trương Quốc Phú (2010) thu được kết quả là hàm lượng TAN và NO₂ trong các bể nuôi tôm sú có bổ sung vi khuẩn *Bacillus* nằm trong khoảng cho phép, ngược lại trong các bể không bổ sung vi khuẩn *Bacillus* thì TAN, NO₂ đều ở mức gây bất lợi cho tôm.

Bảng 2: Biến động hàm lượng NH₄⁺ trong 15 ngày thí nghiệm (mg/L)

Vi khuẩn <i>Bacillus</i>	Các độ mặn thí nghiệm (%)			
	30	70	90	Trung bình
Ngày 5				
Không bổ sung	1,00±0,00 ^{Ba}	1,25±0,35 ^{Ba}	1,00±0,00 ^{Ba}	1,08±0,12 ^B
Bổ sung	0,75±0,00 ^{Aa}	0,75±0,00 ^{Aa}	0,73±0,04 ^{Aa}	0,74±0,01 ^A
Trung bình	0,88±0,14	1,00±0,29	0,88±0,14	
Ngày 10				
Không bổ sung	1,50±0,00 ^{Ba}	1,50±0,00 ^{Ba}	1,00±0,00 ^{Ba}	1,33±0,00 ^B
Bổ sung	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,75±0,00 ^{Aa}	0,58±0,00 ^A
Trung bình	1,00±0,58	1,00±0,58	0,88±0,14	
Ngày 15				
Không bổ sung	1,00±0,00 ^{Bb}	1,50±0,00 ^{Bc}	0,88±0,00 ^{Ba}	1,13±0,06 ^B
Bổ sung	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^A
Trung bình	0,75±0,29	1,00±0,58	0,69±0,24	

Số liệu có chữ cái in thường khác nhau trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$), số liệu có chữ in hoa khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$)

Hàm lượng NO₂ (mg/L)

Kết quả thí nghiệm cho thấy hàm lượng NO₂ giữa các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* và đối chứng khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn thì hàm lượng NO₂ tương đối ổn định trong quá trình thí nghiệm ở mức 0,5 mg/L, các nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn thì hàm lượng NO₂ có biến động nhiều hơn (Bảng 3). Theo Ngô Thị Thu Thảo

và Mã Linh Tâm (2013) bổ sung chế phẩm sinh học *B. subtilis* vào nuôi *Artemia* đã góp phần làm giảm nitrite và ammonia. Các loại men (enzymes) của vi khuẩn *B. subtilis* hoạt động rất hiệu quả trong việc phân hủy protein, carbohydrate và lipid có nguồn gốc động vật hoặc thực vật thành các dạng có cấu trúc đơn giản hơn, dễ được các đối tượng vi sinh vật khác hoặc các đối tượng ăn lọc trong thủy vực hấp thu hơn (Sonnenschein *et al.*, 1993).

Bảng 3: Biến động hàm lượng Nitrite trong 15 ngày thí nghiệm (mg/L)

Vi khuẩn <i>Bacillus</i>	Các độ mặn thí nghiệm (%)			
	30	70	90	Trung bình
Ngày 5				
Không bổ sung	0,88±0,18 ^{Ba}	1,25±0,35 ^{Bb}	1,00±0,00 ^{Bc}	1,04±0,26 ^B
Bổ sung	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^A
Trung bình	0,69±0,09	1,25±0,18	0,75±0,28	
Ngày 10				
Không bổ sung	1,5±0,00 ^{Bb}	1,00±0,00 ^{Ba}	1,00±0,00 ^{Ba}	1,17±0,00 ^B
Bổ sung	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^A
Trung bình	1,00±0,58	0,75±0,28	0,75±0,28	
Ngày 15				
Không bổ sung	1,00±0,00 ^{Bb}	1,50±0,00 ^{Bc}	0,75±0,00 ^{Ba}	1,08±0,00 ^B
Bổ sung	0,63±0,18 ^{Ab}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,50±0,00 ^{Aa}	0,54±0,06 ^A
Trung bình	0,81±0,09	1,00±0,58	0,63±0,09	

Số liệu có chữ cái in thường khác nhau trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$). Số liệu có chữ in hoa khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$)

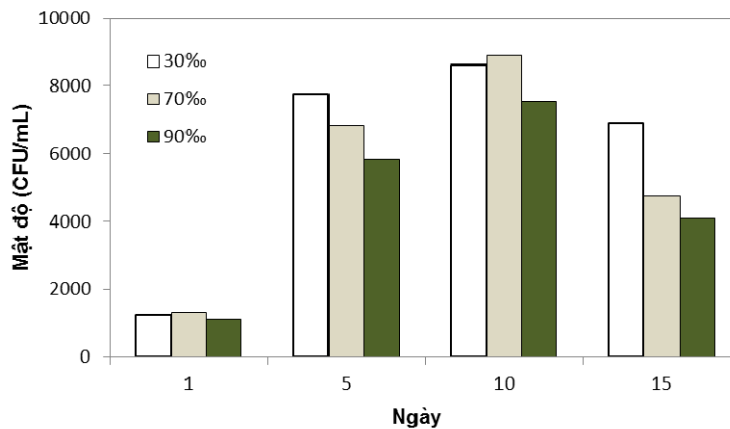
Biến động mật độ vi khuẩn *B. subtilis* trong thí nghiệm

Mật độ vi khuẩn *B. subtilis* ở các nghiệm thức bổ sung CPSH dao động từ $1,1 \times 10^3$ - 9×10^3

CFU/mL. Trong cùng điều kiện được bổ sung CPSH thì mật độ vi khuẩn *B. subtilis* ở độ mặn 30 và 70‰ cao hơn so với 90‰ ($p < 0,05$). Ở 30‰, thời gian thích ứng của *B. subtilis* tương đối nhanh hơn, mật độ vi khuẩn *B. subtilis* ổn định qua các

lần thu mẫu và thời gian tồn tại lâu hơn ở độ mặn 70 hoặc 90‰ (Hình 1). Đỗ Mạnh Hào *et al.* (2014) nghiên cứu ảnh hưởng của các độ mặn 0, 10, 20 và 30‰ đến hoạt lực nitrat hóa của 3 chủng vi khuẩn nitrat hóa tại khu vực nuôi thủy sản ven biển huyện Tiên Lãng và Cát Hải, Hải Phòng. Kết quả thu được cho thấy chủng P113018 có hoạt lực oxy hóa ammon và nitrite cao tại độ mặn 20-30‰ (84% sau 4 ngày), tuy nhiên khi độ mặn tăng lên 30‰ hoặc giảm xuống 0‰ thì hiệu quả loại bỏ ammon của chủng vi khuẩn này chỉ đạt từ 34-50%. Ngoài

yếu tố độ mặn ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn *B. subtilis* thì một nguyên nhân khác có thể do sự xuất hiện và sinh trưởng của *Artemia* trong môi trường nuôi. *Artemia* là đối tượng ăn lọc không chọn lọc, thức ăn của *Artemia* có thể là tảo, vi khuẩn, mùn bã hữu cơ với kích thước <50 μm (Sorgeloos *et al.*, 1980). Sinh trưởng và tỷ lệ sống của *Artemia* đạt cao hơn ở độ mặn cao hơn, do đó nhu cầu lọc thức ăn phục vụ sinh trưởng sẽ cao hơn, mật độ vi khuẩn *Bacillus* giảm xuống thấp trong các độ mặn 70 và 90‰ cũng có thể do hoạt động lọc thức ăn của *Artemia* cao hơn ở các nghiệm thức này.



Hình 1: Biến động mật độ vi khuẩn *B. subtilis* trong các nghiệm thức được bổ sung CPSH

Tỷ lệ sống, sinh trưởng và sinh sản của Artemia

Sau 15 ngày nuôi, khi kết hợp độ mặn 90‰ và có bổ sung vi khuẩn thì *Artemia* đạt tỷ lệ sống cao nhất (65,11%) trong khi đó tỷ lệ sống đạt thấp nhất

(40,44%) ở nghiệm thức 30‰ không bổ sung vi khuẩn (Bảng 4). Trong cùng độ mặn thì việc bổ sung *B. subtilis* làm cho *Artemia* đạt tỷ lệ sống cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với không bổ sung vi khuẩn.

Bảng 4: Tỷ lệ sống của *Artemia* ở các độ mặn và bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* tương ứng

Vi khuẩn <i>Bacillus</i>	Các độ mặn thí nghiệm (‰)			Trung bình
	30	70	90	
Ngày 5				
Không bổ sung	71,91±33,43 ^{Aa}	78,17±35,22 ^{Ab}	83,89±18,21 ^{Ac}	77,99±28,95 ^A
Bổ sung	81,83±33,43 ^{Ba}	83,33±40,28 ^{Bb}	86,78±25,58 ^{Bc}	83,98±33,09 ^B
Trung bình	76,87±33,43	80,75±37,75	85,33±21,90	
Ngày 10				
Không bổ sung	51,33±28,70 ^{Aa}	61,55±36,40 ^{Ab}	63,56±23,10 ^{Ac}	58,81±29,40 ^A
Bổ sung	63,56±23,10 ^{Ba}	62,67±28,70 ^{Aa}	71,33±52,60 ^{Bb}	65,85±34,80 ^B
Trung bình	57,45±25,90	62,11±32,60	67,45±37,80	
Ngày 15				
Không bổ sung	40,44±23,09 ^{Aa}	59,11±23,09 ^{Ab}	61,56±23,09 ^{Ac}	53,70±23,09 ^A
Bổ sung	61,11±23,09 ^{Ba}	61,78±23,09 ^{Ba}	65,10 ±23,09 ^{Bb}	62,67±23,09 ^B
Trung bình	50,78±23,09	60,44±23,09	63,33±23,09	

Số liệu có chữ cái in thường khác nhau trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$). Số liệu có chữ in hoa khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$)

Kết quả về tỷ lệ sống trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Ngô Thị Thu Thảo và Mã Linh Tâm (2013) trên cùng đối tượng *Artemia franciscana*: các nghiệm thức có bổ sung chế phẩm sinh học chứa *Bacillus* đạt tỷ lệ sống 47,5 đến 57,5% sau 15 ngày nuôi. Bên cạnh đó, ở các nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn thì tỷ lệ sống ở 90% cao hơn rất rõ ($p < 0,05$) so với 30 và 70%. Kết quả này phù hợp với nhận định của Sorgeloos *et al.* (1980): *Artemia* là loài rộng muối, hiện diện ở những thủy vực có độ mặn 5 – 300‰, phát triển tốt ở độ mặn 65 – 150‰. Những số liệu thu được cho thấy cả 2 yếu tố độ mặn và việc bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* đã có hiệu quả nâng cao tỷ lệ sống của *Artemia* trong điều kiện thí nghiệm.

Chiều dài của *Artemia* bắt đầu có sự khác biệt giữa các nghiệm thức ($p < 0,05$) kể từ ngày nuôi thứ 5 (Bảng 5). Sau 15 ngày nuôi, trong các nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* thì chiều

dài của *Artemia* cao nhất ở 90‰ (7,31±0,13 mm) và thấp nhất ở 30‰ (6,32±0,15 mm). Ở cùng độ mặn thì chiều dài của *Artemia* ở những nghiệm thức có bổ sung khuẩn *B. subtilis* lớn hơn rất rõ ($p < 0,05$) so với không bổ sung. Kết quả cho thấy rằng, sinh trưởng của *Artemia* tăng dần trong khoảng độ mặn từ 30, 70 đến 90‰. Thêm vào đó việc kết hợp bổ sung chế phẩm sinh học có chứa vi khuẩn *B. subtilis* vào môi trường nuôi *Artemia* đã cho kết quả tốt hơn về tăng trưởng chiều dài của đối tượng này. Ngô Thị Thu Thảo và Mã Linh Tâm (2013) cũng thu được kết quả là việc bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* vào môi trường nuôi (30‰) đã làm cho *Artemia* tăng trưởng chiều dài nhanh hơn. Các tác giả thu được kết quả vào ngày 15, ở nghiệm thức không bổ sung CPSH thì *Artemia* chỉ có chiều dài 5,25 mm trong khi đó ở nghiệm thức bổ sung CPSH + glucose thì *Artemia* có thể đạt 7,47 mm.

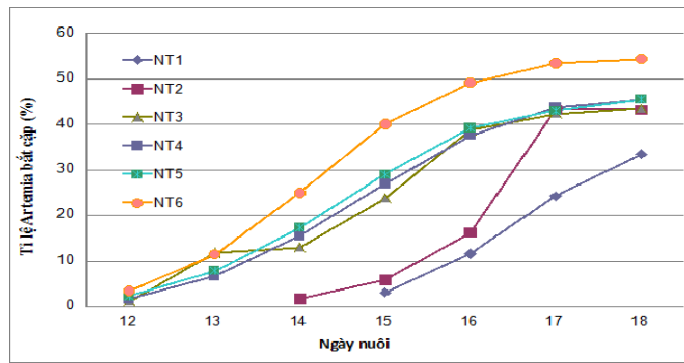
Bảng 5: Chiều dài (mm) của *Artemia* trong quá trình nuôi

Vi khuẩn <i>Bacillus</i>	Các độ mặn thí nghiệm (‰)			Trung bình
	30	70	90	
Ngày 1				
Không bổ sung	0,51±0,03 ^{Aa}	0,50±0,01 ^{Aa}	0,50±0,01 ^{Aa}	0,51±0,02 ^A
Bổ sung	0,50±0,01 ^{Aa}	0,51±0,01 ^{Aa}	0,50±0,01 ^{Aa}	0,51±0,02 ^A
Trung bình	0,51±0,02	0,51±0,02	0,50±0,01	
Ngày 5				
Không bổ sung	1,51±0,11 ^{Aa}	1,77±0,1 ^{Ab}	2,19 ± 0,13 ^{Ac}	1,82±0,11 ^A
Bổ sung	2,51 ± 0,13 ^{Ba}	2,81±0,13 ^{Bb}	3,36 ± 0,18 ^{Bc}	2,89±0,15 ^B
Trung bình	2,01±0,12	2,29±0,12	2,87±0,15	
Ngày 10				
Không bổ sung	4,11±0,11 ^{Aa}	5,28±0,12 ^{Ab}	6,72±0,12 ^{Ac}	5,22±0,12 ^A
Bổ sung	6,58±0,12 ^{Ba}	7,09±0,14 ^{Bb}	7,61±0,17 ^{Bc}	7,09±0,14 ^B
Trung bình	5,35±0,12	6,19±0,13	6,94 ± 0,14	
Ngày 15				
Không bổ sung	6,32±0,15 ^{Aa}	7,12±0,17 ^{Ab}	7,31±0,13 ^{Ac}	6,92±0,15 ^A
Bổ sung	7,43±0,1 ^{Ba}	7,83±0,11 ^{Bb}	8,35±0,12 ^{Bc}	7,87±0,11 ^B
Trung bình	6,88±0,13	7,8±0,14	7,83 ± 0,13	

Số liệu có chữ cái in thường khác nhau trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$). Số liệu có chữ in hoa khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$)

Trong các nghiệm thức 70 và 90‰ có bổ sung CPSH, chiều dài của *Artemia* khác biệt rất rõ so với không bổ sung CPSH, bên cạnh ảnh hưởng của độ mặn thì có thể thấy ảnh hưởng tích cực của vi khuẩn *Bacillus* trong việc cải thiện môi trường, hỗ trợ hệ tiêu hóa hoặc tăng hàm lượng chất dinh dưỡng cho *Artemia*. Trong điều kiện độ mặn cao (70 - 90‰) các ảnh hưởng tích cực này vẫn thể hiện rõ chứng tỏ vi khuẩn *B. subtilis* vẫn có thể tồn tại và phát triển ở các độ mặn cao hơn nước biển thông thường.

Vào ngày nuôi thứ 12, *Artemia* bắt đầu có hiện tượng bắt cặp (Hình 2). Các nghiệm thức 70 và 90‰ kể cả bổ sung và không bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* thì *Artemia* bắt cặp sớm nhất trong khi đó nghiệm thức 30‰ không bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* thì bắt cặp chậm nhất (ngày 15). Sau 18 ngày nuôi, *Artemia* có tỉ lệ bắt cặp cao nhất các nghiệm thức 90‰, đặc biệt nghiệm thức 90‰ có bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* cho tỉ lệ bắt cặp cao nhất (54,3%).



Hình 2: Tỷ lệ bắt cặp của Artemia trong thời gian thí nghiệm

Chiều dài của Artemia khi bắt cặp sinh sản lớn nhất ở nghiệm thức 90% có bổ sung vi khuẩn *B. subtilis*. Trong các đợt thu mẫu, chiều dài của Artemia cái đa số tuân theo xu hướng là cao hơn ở độ mặn cao ($p < 0,05$) và cao hơn ở các nghiệm thức

có bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* ($p < 0,05$) điều đó chứng tỏ độ mặn cao (90%) và việc bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* đã góp phần thúc đẩy tăng trưởng của Artemia đồng thời thúc đẩy quá trình thành thực sinh sản (Bảng 6 và Bảng 7)

Bảng 6: Chiều dài con cái (mm) khi tham gia sinh sản qua các đợt thu mẫu

Vi khuẩn <i>B. subtilis</i>	Các độ mặn thí nghiệm (%)			Trung bình
	30	70	90	
Đợt 1				
Không bổ sung	6,81±0,08 ^{Ab}	6,33±0,09 ^{Aa}	6,91± 0,09 ^{Ac}	6,68±0,09 ^A
Bổ sung	7,77± 0,09 ^{Ba}	8,01±0,09 ^{Bb}	8,44±0,08 ^{Bc}	8,07±0,09 ^B
Trung bình	7,29±0,09	7,17±0,09	7,67±0,09	
Đợt 2				
Không bổ sung	7,99±0,08 ^{Ac}	7,57±0,10 ^{Aa}	7,77±0,10 ^{Ab}	7,82±0,12 ^A
Bổ sung	8,81±0,10 ^{Bb}	8,76±0,09 ^{Ba}	9,13±0,11 ^{Bc}	8,90±0,10 ^B
Trung bình	8,4±0,09	8,17±0,09	8,45 ±0,11	
Đợt 3				
Không bổ sung	8,70±0,09 ^{Ac}	8,18±0,10 ^{Aa}	8,44±0,08 ^{Ab}	8,44±0,01 ^A
Bổ sung	9,51±0,08 ^{Ba}	9,47±0,09 ^{Ba}	10,14±0,16 ^{Bb}	9,71±0,11 ^B
Trung bình	9,11±0,08	8,83±0,10	9,29 ±0,12	

Số liệu có chữ cái in thường khác nhau trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$). Số liệu có chữ in hoa khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$)

Bảng 7: Chiều dài con đực (mm) khi tham gia sinh sản qua các đợt thu mẫu

Vi khuẩn <i>B. subtilis</i>	Các độ mặn thí nghiệm (%)			Trung bình
	30	70	90	
Đợt 1				
Không bổ sung	5,71±0,08 ^{Aa}	5,48±0,09 ^{Aa}	6,20± 0,09 ^{Ab}	5,80±0,09 ^A
Bổ sung	6,81± 0,08 ^{Ba}	6,82±0,09 ^{Ba}	7,58±0,08 ^{Bb}	7,07±0,09 ^B
Trung bình	6,26±0,08	6,15±0,09	6,89±0,09	
Đợt 2				
Không bổ sung	6,73±0,07 ^{Aa}	6,76±0,10 ^{Aa}	6,80±0,10 ^{Ab}	6,76±0,09 ^A
Bổ sung	7,63±0,10 ^{Ba}	7,74±0,10 ^{Bb}	8,14±0,10 ^{Bc}	7,84±0,10 ^B
Trung bình	7,18±0,09	7,25±0,10	7,47±0,10	
Đợt 3				
Không bổ sung	7,42±0,08 ^{Aa}	7,51±0,09 ^{Ab}	7,70±0,09 ^{Ac}	7,54±0,09 ^A
Bổ sung	8,43±0,08 ^{Ba}	8,54±0,08 ^{Bb}	9,13±0,10 ^{Bc}	8,70±0,09 ^B
Trung bình	7,93±0,08	8,03±0,08	8,42±0,10	

Số liệu có chữ cái in thường khác nhau trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$), số liệu có chữ in hoa khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$)

Tổng số phôi *Artemia* đạt cao nhất ở nghiệm thức 90‰ có bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* và có sự khác biệt ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức (Bảng 8). Trong cùng độ mặn thì việc bổ sung chế phẩm chứa vi khuẩn *B. subtilis* cũng cho kết quả cao hơn ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Kết quả cho thấy rằng việc bổ sung chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn *B. subtilis* đã giúp nâng cao sức sinh sản của *Artemia* trong điều kiện độ mặn tăng dần từ 30 đến 90‰. Phạm Thị Tuyết Ngân và Trần Sương Ngọc (2014) nghiên cứu bổ sung các loại CPSH có chứa vi khuẩn *Bacillus* trong quá trình nuôi *Artemia*. Các tác giả cũng thu được kết quả là khi bổ sung CPSH thì số phôi mà *Artemia* sinh sản cao hơn so với đối chứng. Vi khuẩn *Bacillus* khi được bổ sung vào môi trường nuôi, có khả năng sử dụng các hạt thức ăn làm giá thể cho quá trình phát triển.

Khi *Artemia* lọc các hạt thức ăn có mang vi khuẩn đã được bổ sung thêm nguồn dinh dưỡng cho quá trình sinh trưởng và sinh sản. Thêm vào đó, bản thân vi khuẩn cũng chứa các loại enzyme thúc đẩy quá trình tiêu hóa tốt hơn thông qua quá trình chuyển hóa thành phần thức ăn thành dạng dễ hấp thu hơn. Ziaei-Nejad *et al.* (2006) đã nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung CPSH chứa vi khuẩn *Bacillus* đến hoạt động của các enzyme trong hệ tiêu hóa của tôm thẻ Ấn Độ *Fenneropenaeus indicus* ở các giai đoạn Nauplius (1-2) đến Zoea 3; Mysis 1 đến PL14 và PL30 đến PL120. Trong hầu hết các nghiệm thức, các hoạt tính chuyên biệt của men amylase, tổng protease, và lipase trong hệ tiêu hóa của tôm có bổ sung CPSH cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng.

Bảng 8: Trung bình số phôi *Artemia* tham gia sinh sản qua các đợt thu mẫu (số phôi/con cái/lần đẻ)

Vi khuẩn <i>B. subtilis</i>	Các độ mặn thí nghiệm (%)			
	30	70	90	Trung bình
	Đợt 1			
Không bổ sung	25,63±3,82 ^{Aa}	28,00±7,53 ^{Ab}	29,33±9,49 ^{Ac}	27,66±6,95 ^A
Bổ sung	28,37±8,35 ^{Ba}	34,50±10,45 ^{Bb}	34,93±5,33 ^{Bb}	32,60±8,04 ^B
Trung bình	27,43±6,08	31,25±8,99	32,13±9,97	
	Đợt 2			
Không bổ sung	22,43±12,25 ^{Aa}	27,67±6,49 ^{Ab}	29,37±2,16 ^{Ac}	26,49±6,97 ^A
Bổ sung	27,70±5,43 ^{Ba}	31,13±2,39 ^{Bb}	36,43±4,48 ^{Bc}	31,75±4,10 ^B
Trung bình	25,06±8,84	29,40±4,44	32,90±3,32	
	Đợt 3			
Không bổ sung	22,65±12,57 ^{Aa}	31,97±3,06 ^{Ab}	34,38±4,09 ^{Ab}	30,84±6,03 ^A
Bổ sung	32,30±8,50 ^{Ba}	35,03±5,14 ^{Bb}	43,87±3,80 ^{Bc}	37,74±4,94 ^B
Trung bình	28,58±10,17	33,98±3,45	40,32±4,84	

Số liệu có chữ cái in thường khác nhau trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$), số liệu có chữ in hoa khác nhau trong cùng một cột cho thấy sự khác biệt ($p < 0,05$)

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Vi khuẩn *B. subtilis* có thể tồn tại và phát triển ở độ mặn 90‰.

Cùng với độ mặn phù hợp, việc bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* vào môi trường nuôi *Artemia* đã có tác động tốt đến sinh trưởng và sinh sản của đối tượng này.

4.2 Đề xuất

Cần thực hiện thêm các thí nghiệm về sự tác động của vi khuẩn *Bacillus subtilis* đến sự sinh trưởng và sinh sản của *Artemia* ở độ mặn cao, đồng thời nên mở rộng quy mô thí nghiệm để tìm hiểu khả năng ứng dụng trong thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balebona M.C., Andreu M.J., Bordas M.A., Zorrilla I., Moriniño M.A., Borrego J.J. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* from cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.). Applied and Environmental Microbiology 64: Pages 4269–4275.
- Ben kahla-Nakbi A., Chaieb K., Besbes A., Zmantar T., Bakhrouf A. 2006. Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks. Veterinary Microbiology, 117: Pages 321–327.
- Browne, R.A., S.E. Sallee, D.S. Grosch, W.O. Sergeti and S.M. Purser. 1984.

- Partitioning genetic and environment components of reproduction and lifespan in *Artemia*. Ecology 63(3): 949-960.
4. Đỗ Mạnh Hào, Chu Văn Thuộc và Lê Văn Dương. 2014. Đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến hoạt lực của ba chủng vi khuẩn nitrate hóa có khả năng chịu độ mặn cao. Tuyển tập Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh học biển và phát triển bền vững lần thứ 2. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. ISBN: 978-604-913-259-9. Trang 637-644.
 5. Far H.Z., C.R.B. Saad, M.H. Daud, S.A. Harmin and S. Shakibazadeh. 2009. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp *Litopenaeus vannamei*. African Journal of Biotechnology 8, 14: 3369-3376.
 6. Hadi Zokaei Far. 2009. Effects of probiotics on the growth and survival of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their inhibitory roles against *Vibrio parahaemolyticus*. http://psasir.upm.edu.my/5792/1/a__FP_2009_10.pdf.
 7. Johnson, D.A. 1980. Evaluation of various diets for optimal growth and survival of selected life stages of *Artemia*. In: G. Persone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jasper (Editors). The Brine Shrimp *Artemia* (Vol.3). Corpus Christi, Texas, USA, 192pp.
 8. Lim, L.C., A. Soh, P. Dhert and P. Sorgeloos. 2001. Production and application of ongrown *Artemia* in freshwater ornamental fish farm, Aquaculture Economics and Management. Vol. 5: Page 211-228.
 9. Lora-Vilchis, M.C. and D. Voltolina. 2003. Growth and survival of *Artemia franciscana* (Kellogg) fed with *Chaetoceros muelleri* Lemmerman and *Chlorella capsualata* Guillard. Rev. Invest. Mar. 24: Page 241-246.
 10. Luna-González A., Maeda-Martínez A.N., Sainz J.C., Ascencio-Valle F. 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. Diseases of Aquatic Organisms 49: 221-226.
 11. Ngô Thị Thu Thảo và Mã Linh Tâm. 2013. Ảnh hưởng của việc bổ sung glucose và chế phẩm sinh học đến sinh trưởng và sinh sản của *Artemia franciscana*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ số 29/2013 (Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học). ISSN: 1859-2333. Trang 96-103.
 12. Ngô Thị Thu Thảo và Nguyễn Thị Ngoan. 2014. Ảnh hưởng của các phương pháp bổ sung chế phẩm sinh học đến sinh trưởng và sinh sản của *Artemia franciscana* Vĩnh Châu. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ số 32/2014 (Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học). ISSN: 1859-2333. Trang 94-99.
 13. Ngô Thị Thu Thảo và Phạm Thị Tuyết Ngân. 2011. Ảnh hưởng của bổ sung các loại chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn *Bacillus* trong ương ấu trùng ốc hương. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học thủy sản lần 4. Nhà xuất bản Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh: Trang 55-64.
 14. Nguyễn Văn Hòa, Huỳnh Thanh Tới, Nguyễn Thị Hồng Vân và Trần Hữu Lễ. 2006. Nuôi tảo *Chaetoceros* làm thức ăn cho hệ thống ao nuôi *Artemia*. Khoa Thủy sản. Đại học Cần Thơ. Tạp chí Nghiên cứu khoa học 2006. Trang 52-61.
 15. Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Thị Hồng Vân, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Phạm Thị Tuyết Ngân, Huỳnh Thanh Tới và Trần Hữu Lễ. 2007. *Artemia*: Nghiên cứu và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội. 134 trang.
 16. Phạm Thị Tuyết Ngân và Trần Sương Ngọc. 2014. Ảnh hưởng của hỗn hợp *Bacillus* sp. chọn lọc lên tăng trưởng của *Artemia franciscana*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. ISSN: 1859-2333. Số chuyên đề Thủy sản (2): Trang 184-191.
 17. Phạm Thị Tuyết Ngân và Trương Quốc Phú. 2010. Biến động các yếu tố môi trường và mật độ *Bacillus* sp chọn lọc trong bể nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ số 14b/2010. ISSN: 1859-2333: Trang 29-42.
 18. 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.
 19. Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta. 1998. Probiotics in aquaculture: A case study of

- probiotics for larvae of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). In: T.W. Flegel (editor). Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand.
20. Shailender, M., P.V. Krishna and B.C. Suresh. 2012. Effect of probiotic on growth and survival of post larvae of giant freshwater prawn, *Macrobrachum rosenbergii* (De Man). International Journal of Bioassays (IJB), 12: Page184-190.
21. Sonnenschein A.L., Losick R., Hoch J.A. 1993. *Bacillus subtilis* and Others GramPositive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC.
22. Sorgeloos P. 1980. Life history of the brine shrimp *Artemia*, In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Japers (Editors). The brine shrimp *Artemia*, Proceeding of the International Symposium on the brine shrimp *Artemia salina*. Corpus Chritis, Texas, USA, 20-23 August 197: Page 19-22.
23. Ziaei-Nejad S., Rezaei M.H., Takami G.A., Lovett A.L., Ali-Reza Mirvaghefi, Shakouri M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 252, Issues 2-4: Page 516-524.