



SỰ PHÁT TRIỂN VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA VI KHUẨN *Bacillus amyloliquefaciens* TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI *Artemia* Ở ĐỘ MẶN CAO

Ngô Thị Thu Thảo, Võ Thị Kiều Diễm, Nguyễn Thị Phường và Phạm Thị Tuyết Ngân

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 06/01/2016

Ngày chấp nhận: 30/08/2016

Title:

Growth and effects of *Bacillus amyloliquefaciens* in *Artemia* culture medium at high salinity

Từ khóa:

Bacillus amyloliquefaciens, sinh trưởng, *Artemia*, độ mặn cao

Keywords:

Bacillus amyloliquefaciens, growth, *Artemia*, high salinity

ABSTRACT

This study evaluated the development of *Bacillus amyloliquefaciens* in high salinity conditions and effects of adding this bacteria strain into the culture medium of *Artemia franciscana*. In the first experiment, *B. amyloliquefaciens* was inoculated at a density of 10^6 CFU/mL in different salinities of 15‰ (control treatment), 80‰, 85‰, 90‰, 95‰ and 100‰. After 10 days, the result showed that *B. amyloliquefaciens* could be able to grow and develop at the salinity as high as 90‰ (3.02 ± 0.01 log CFU/mL). The second experiment determined the ability of *B. amyloliquefaciens* to improve environmental factors and bottom sediment in *Artemia* culture condition at the salinity of 90‰, in the presence or absence of muddy sediment. *Artemia* were cultured at the density of 100 ind./L and were fed with shrimp feed (Number 0 nursing feed). After 15 days, the survival rate (74.8%) and the mating rate (83.3%) in treatment supplemented with *B. amyloliquefaciens*, and without muddy sediment were statistically different from those treatments without bacteria supplementation. In the treatment with *B. amyloliquefaciens* and muddy sediment, *Artemia* reached higher length (8.7mm) and higher fecundity compared to others ($p < 0.05$), and the organic matter in the bottom sediment was significantly decreased. The results showed that at salinity of 90‰, *B. amyloliquefaciens* can survive and develop normally, as well as can reduce the organic matters in bottom sediment, improve the growth and reproduction of *Artemia*.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đánh giá sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* ở điều kiện độ mặn cao và ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn này trong môi trường nuôi *Artemia franciscana*. Trong thí nghiệm 1, vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* được nuôi ở các độ mặn 15‰ (đối chứng), 80‰, 85‰, 90‰, 95‰ và 100‰ với mật độ 10^6 CFU/mL. Kết quả sau 10 ngày nuôi cho thấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có khả năng sinh trưởng và phát triển ở độ mặn cao nhất là 90‰ ($3,02 \pm 0,01$ log CFU/mL). Thí nghiệm 2 nghiên cứu khả năng cải thiện các yếu tố môi trường nước và nền đáy của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trong điều kiện nuôi *Artemia* ở độ mặn 90‰, có nền đáy bùn hoặc không có nền đáy bùn. *Artemia* được nuôi với mật độ 100 con/L và cho ăn bằng thức ăn tôm sú số 0. Sau 15 ngày nuôi, tỉ lệ sống của *Artemia* (74,8%) và tỉ lệ bắt cặp (83,3%) ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* và không có nền đáy bùn cao hơn ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn này. Ở nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* và có nền đáy bùn thì *Artemia* đạt chiều dài (8,7 mm) và sức sinh sản cao hơn so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$), cũng ở nghiệm thức này thì việc bổ sung vi khuẩn đã giúp làm giảm đáng kể hàm lượng chất hữu cơ trong bùn đáy. Kết quả thí nghiệm cho thấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có thể tồn tại, phát triển ở độ mặn 90‰, góp phần cải thiện nền đáy môi trường nuôi, sinh trưởng và sinh sản của *Artemia*.

Trích dẫn: Ngô Thị Thu Thảo, Võ Thị Kiều Diễm, Nguyễn Thị Phường và Phạm Thị Tuyết Ngân, 2016. Sự phát triển và ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* trong môi trường nuôi *Artemia* ở độ mặn cao. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 45b: 101-111.

1 GIỚI THIỆU

Vi khuẩn *Bacillus* spp đã được sử dụng như một chế phẩm sinh học giúp cải tiến chất lượng nước nhờ vào tác dụng phân hủy các hợp chất hữu cơ và làm giảm số lượng mầm bệnh tiếp cận với các loài thủy sản nuôi. Theo Moriarty (1998) thì chế phẩm sinh học (CPSH) chứa vi khuẩn *Bacillus* phát huy hiệu quả trong việc ngăn chặn các loài vi khuẩn phát sáng *Vibrio* dựa vào sự cạnh tranh giữa các loài vi khuẩn và các hợp chất kháng sinh khác nhau do *Bacillus* tạo ra. Nghiên cứu gần đây cho thấy, vi khuẩn có thể được sử dụng như nguồn thức ăn bổ sung thích hợp cho *Artemia* khi việc cung cấp tảo không đáp ứng đủ thức ăn cho quần thể *Artemia* (Huynh Thanh Toi *et al.*, 2013). Đồng thời nhóm vi khuẩn *Bacillus* cũng giúp cải thiện sự phát triển của ấu trùng *Artemia* kháng lại vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* gây bệnh (Abdelkarim *et al.*, 2010).

Nghiên cứu của Ngô Thị Thu Thảo và Nguyễn Thị Ngoan (2014) cho thấy tỷ lệ sống của *Artemia* đạt cao nhất khi bổ sung đồng thời CPSH vào tảo và vào môi trường nuôi ($94,33 \pm 0,6\%$), đồng thời sức sinh sản của *Artemia* biến động từ 100-126 phôi/con cái và đạt cao nhất khi CPSH được bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi *Artemia* ở độ mặn 30‰. Trong nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân và Trần Sương Ngọc (2014), tỷ lệ sống của *Artemia* ở nghiệm thức bổ sung B37 (*Bacillus cereus*) cùng với B41 (*Bacillus amyloliquefaciens*) đạt cao nhất (88%) và khác biệt có ý nghĩa so với không bổ sung vi khuẩn (66,7%). Trong thực tế, *Artemia* thường được nuôi ở độ mặn cao (>80‰) do đặc điểm phân bố của loài nhằm hạn chế tác động của địch hại và sự cạnh tranh của các loài ăn lọc khác. Các nghiên cứu về sự phát triển và ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường nuôi *Artemia* ở độ mặn cao vẫn còn hạn chế. Mặt khác, theo Verschuere *et al.*, (2000) nguyên tắc chung để ứng dụng thành công vi khuẩn hữu ích là nên sử dụng loài phân lập trên chính môi trường xuất hiện của chúng và ứng dụng sẽ đạt hiệu quả cao hơn. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* ở các độ mặn cao và ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn này đến các yếu tố môi trường, nền đáy, sinh trưởng và sinh sản của *Artemia* trong quá trình nuôi.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đánh giá sự phát triển của vi khuẩn

Bacillus amyloliquefaciens (B41) ở các độ mặn cao

2.1.1 Nguồn vi khuẩn thí nghiệm

Vi khuẩn sử dụng cho cả 2 thí nghiệm trong nghiên cứu này là *Bacillus amyloliquefaciens* phân

lập từ ao nuôi tôm sú tại tỉnh Sóc Trăng và được nuôi cấy tại phòng thí nghiệm Bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Chủng *B. amyloliquefaciens* được phục hồi trên môi trường Tripticase Soya Agar (TSA). Sau đó được tiếp tục nuôi tăng sinh bằng môi trường Luria Bertani (LB). Độ mặn của môi trường nuôi tăng sinh tương ứng với các độ mặn (15, 80, 85, 90, 95 và 100‰). Sau khi nuôi tăng sinh, sinh khối vi khuẩn được thu bằng phương pháp ly tâm trong 10 phút với vận tốc 10.000 vòng/phút. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo OD tại bước sóng 600 nm của máy đo quang phổ (Leonel *et al.*, 2006). Mẫu đối chứng không có vi khuẩn được đo đầu tiên và có giá trị bằng 0. Dung dịch huyền phù vi khuẩn cần đo sẽ có giá trị OD trong khoảng 0,125 - 1,25. Theo tiêu chuẩn Mac Farland giá trị OD bằng 1 tương ứng mật độ vi khuẩn $1,2 \times 10^9$ CFU/ mL. Mật độ vi khuẩn được tính theo công thức:

Mật độ vi khuẩn (CFU/ mL) = $1,2 \times 10^9 \times OD \times$ tỷ lệ pha loãng.

2.1.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1 được thực hiện gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần với độ mặn lần lượt là 15‰ (đối chứng), 80‰, 85‰, 90‰, 95‰ và 100‰. Các bình thủy tinh nuôi cấy vi khuẩn có thể tích 2 lít được gắn sục khí và được bố trí trong phòng có máy điều hòa nhiệt độ giữ ổn định ở 28°C trong suốt thời gian thí nghiệm. Nước nuôi vi khuẩn *Bacillus* được tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C với áp suất là 1 bar trong 20 phút. Vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* được bố trí với mật độ 10^6 CFU/mL vào các bình nuôi. Dinh dưỡng cho vi khuẩn được bổ sung bằng thức ăn tôm sú số 0 vào ngày đầu tiên với liều lượng 150 mg/L. Thí nghiệm được thực hiện trong 10 ngày.

2.1.3 Thu thập số liệu về các yếu tố môi trường

Các yếu tố môi trường như: pH được đo trực tiếp bằng máy đo pH hiệu YSI 556, hàm lượng nitrite, TAN được kiểm tra vào các ngày 1, 3, 5, 7, 10 của quá trình thí nghiệm bằng bộ test SERA, sản xuất tại Đức.

2.1.4 Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn

Mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* được thu cùng thời điểm với mẫu xác định chất lượng nước. Chuẩn bị môi trường cấy vi khuẩn và các ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý (0,85%) được tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút để pha loãng mẫu. Dùng pipet hút 1 mL mẫu vào 9 mL nước muối sinh lý để đạt mật độ pha loãng 10^{-1} , trộn đều và dùng pipet hút 1 mL mẫu nước ở độ pha loãng 10^{-1} cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 9 mL nước

muối sinh lý để được độ pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục thực hiện thao tác tương tự để được độ pha loãng cần đạt. Sau khi mẫu được pha loãng, sử dụng micropipete hút 100 μ L dung dịch vi khuẩn cho vào các đĩa chứa môi trường chuyên biệt cho giống *Bacillus*, mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần, sau đó dùng que thủy tinh tán đều đến khi mẫu khô. Các đĩa đã cấy vi khuẩn 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. Xác định số lượng khuẩn lạc trong mỗi đĩa môi trường và tính giá trị trung bình. Mật độ vi khuẩn được tính theo công thức:

$$\text{Đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU/ mL)} = \text{số khuẩn lạc} \times \text{độ pha loãng} \times 10$$

Cách xác định mật độ vi khuẩn trong bùn: chuyển 1 g mẫu bùn từ mỗi bình thủy tinh nuôi *Artemia* sang ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý đã tiệt trùng, trộn đều bằng máy trộn Vortex khoảng 1 phút để được độ pha loãng 10^{-1} . Sau đó lấy từ mỗi mẫu này 1 mL dạng dung dịch huyền phù vi khuẩn tại phần giữa của ống nghiệm chuyển sang một ống nghiệm đã tiệt trùng chứa 9 mL dung dịch được độ pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục pha loãng mẫu tùy thuộc vào mật độ vi khuẩn trong đáy bùn sau đó thực hiện nuôi cấy giống như vi khuẩn trong môi trường nước.

2.1.5 Kiểm tra khả năng sinh bào tử

Khả năng sinh bào tử của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* ở các độ mặn khác nhau được thực hiện bằng phương pháp nhuộm Gram bào tử.

Bảng 1: Cách bố trí và ký hiệu các nghiệm thức thí nghiệm

Nghiệm thức	Ký hiệu	Vi khuẩn <i>B. amyloliquefaciens</i>	Bùn đáy
1	KĐ	Không bổ sung	Không
2	CĐ	Không bổ sung	Có (đầy 5,0cm)
3	KĐ+Bac	Có bổ sung	Không
4	CĐ+Bac	Có bổ sung	Có (đầy 5,0cm)

Artemia franciscana được ấp nở sau 24 giờ và bố trí vào các bình thủy tinh có thể tích 2 Lít với mật độ là 100 con/Lít. Hàng ngày *Artemia* được cho ăn 2 lần vào lúc 7 giờ sáng và 17 giờ chiều. Trong 3 ngày đầu, *Artemia* được cho ăn tảo *Chaetoceros* (50.000 tế bào/mL). Kể từ ngày thứ 4 thức ăn tôm sú số 0 được cho ăn theo khẩu phần tham khảo của Nguyen Van Hoa (1993) với đơn vị tính là mg/con/ngày như sau: Ngày 4: 0,0305; Ngày 8: 0,0776; Ngày 12, 13: 0,1847; Ngày 14, 15: 0,2215. Trước khi cho ăn, thức ăn được nghiền qua lưới 50 μ m, sau đó trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 - 6°C và được thay mới sau mỗi 2 ngày bảo quản.

Vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* được nuôi tăng sinh để thu sinh khối và bổ sung vào các bình thủy

Nhỏ một giọt nước cất lên lame, dùng que cấy nhặt một ít vi khuẩn trải đều lên giọt nước cất. Để khô ở nhiệt độ phòng, sau đó hơ lướt lame trên ngọn lửa đèn cồn hai hoặc ba lần. Nhỏ dung dịch malachite green 5% lên vi khuẩn được cố định trên lame, đặt lame lên cốc thủy tinh 25 mL chứa nước đang đun sôi trên bếp điện, thời gian 5 phút, sau đó rửa sạch bằng nước máy rồi để khô ở nhiệt độ phòng. Nhuộm tiếp với dung dịch safranin trong 45 giây. Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100 \times , kết quả nhuộm là bào tử bắt màu xanh và thành tế bào bắt màu hồng.

2.2 Nghiên cứu sự phát triển và ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trong môi trường nuôi *Artemia* ở độ mặn cao

2.2.1 Vật liệu và phương pháp bố trí

Nguồn nước và bùn bố trí thí nghiệm được lấy từ ao nuôi *Artemia* ở Vĩnh Châu được hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút trước khi bố trí thí nghiệm.

Từ kết quả của thí nghiệm 1, tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trong môi trường nuôi *Artemia*. Trong thí nghiệm 2 tất cả các nghiệm thức đều nuôi *Artemia* và được bố trí với độ mặn cao nhất mà vi khuẩn có khả năng phát triển ở Thí nghiệm 1 (90‰). Thí nghiệm 2 gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần và kéo dài trong 22 ngày. Bảng 1 trình bày cách bố trí và ký hiệu của các nghiệm thức thí nghiệm.

Artemia định kỳ 5 ngày/lần. Mật độ vi khuẩn bổ sung là 10^6 CFU/mL.

2.2.2 Thu thập các chỉ tiêu về yếu tố môi trường và mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens*

Các yếu tố môi trường như pH được đo trực tiếp bằng máy đo pH (YSI 556), hàm lượng nitrite và TAN ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) được kiểm tra sau mỗi 5 ngày bằng bộ test SERA (sản xuất tại Đức). Tổng hàm lượng chất hữu cơ trong nền đáy bùn (TOM) được xác định vào ngày 1 và ngày 15 của quá trình thí nghiệm theo phương pháp nung ở nhiệt độ 540°C trong 2 giờ.

Mẫu nước và mẫu bùn được thu để xác định mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* vào các ngày 1, 5, 10 và 15 của quá trình thí nghiệm. Việc xác

định mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* được thực hiện tương tự như Thí nghiệm 1.

2.2.3 Thu thập các chỉ tiêu về sinh trưởng và sinh sản của *Artemia*

Mẫu *Artemia* được thu để đo chiều dài vào ngày 1, 5, 10, 15 của quá trình thí nghiệm. Ở ngày nuôi thứ 10 và 15 các cặp *Artemia* tham gia sinh sản được thu và tách rời con đực và con cái để đo chiều dài của con đực và cái, mỗi lần thu 10 con/bình nuôi. Chiều dài *Artemia* được đo từ đỉnh đầu đến tận cùng của đuôi dưới kính lúp Olympus (độ phóng đại từ 0,5-4,0) có gắn trục vi thị kính.

Số con *Artemia* còn sống ở mỗi bình nuôi được đếm vào ngày 1, 5, 10, 15 để xác định tỷ lệ sống. Tỷ lệ sống (%) = 100 × (Số con còn sống/Số con thả ban đầu).

Tỉ lệ bắt cặp của *Artemia* được xác định bằng cách đếm số cặp *Artemia* vào ngày thứ 10 và 15 của quá trình thí nghiệm.

Tỷ lệ bắt cặp (%) = 100 × (Số cặp/Số *Artemia* còn sống)

Sau khi *Artemia* bắt cặp và mang trứng, 15 con cái/nghiệm thức được thu mẫu và mổ túi ấp của

từng con để đếm số phôi và xác định tỷ lệ *Artemia* cái sinh trứng bào xác (%) và tỷ lệ đẻ trứng/tổng số phôi (%). Quá trình thu mẫu được tiến hành 4 lần liên tục, mỗi lần cách nhau 3 ngày.

2.3 Phương pháp xử lí số liệu

Sử dụng chương trình Excel để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và vẽ đồ thị. Phần mềm SPSS 16.0 được sử dụng để so sánh thống kê các giá trị trung bình giữa các nghiệm thức bằng phương pháp ANOVA một nhân tố và phép thử Duncan ở độ tin cậy $p < 0,05$.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Đánh giá sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* (B41) ở các độ mặn cao

3.1.1 Biến động các yếu tố môi trường

Giá trị pH ở các nghiệm thức dao động từ 8,0-8,2 và không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$). Theo nghiên cứu của Briggs and Funge-Smith (1994) thì nguồn nước có pH dao động trong khoảng 7,5 – 8,5 là điều kiện tối ưu cho các nhóm vi khuẩn tăng trưởng.

Bảng 2: Trung bình giá trị pH của các nghiệm thức

Độ mặn (%)	Ngày thí nghiệm				
	1	3	5	7	10
15	8,0±0,00 ^a	8,10±0,14 ^a	8,15±0,07 ^a	8,15±0,07 ^a	8,05±0,07 ^a
80	8,0±0,14 ^a	8,15±0,07 ^a	8,20±0,14 ^a	8,20±0,00 ^a	8,10±0,00 ^a
85	8,0±0,00 ^a	8,10±0,00 ^a	8,15±0,07 ^a	8,20±0,14 ^a	8,20±0,00 ^a
90	8,0±0,14 ^a	8,15±0,07 ^a	8,20±0,00 ^a	8,03±0,00 ^a	8,20±0,00 ^a
95	8,0±0,14 ^a	8,10±0,00 ^a	8,15±0,07 ^a	8,25±0,07 ^a	8,20±0,14 ^a
100	8,0±0,00 ^a	8,10±0,14 ^a	8,20±0,00 ^a	8,30±0,00 ^a	8,20±0,00 ^a

Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Hàm lượng TAN có xu hướng tăng từ ngày 1 đến ngày 10, tuy nhiên ở các độ mặn cao (>95%) thì hàm lượng TAN hầu như tăng rất ít theo thời gian thí nghiệm (Bảng 3). ở ngày đầu bố trí thí nghiệm hàm lượng TAN cao hơn ở các nghiệm thức có độ mặn thấp hơn (15, 80 và 85%) có thể vi

khuyến *B. amyloliquefaciens* đã thích ứng nhanh hơn ở các độ mặn thấp và bắt đầu phân hủy dinh dưỡng cung cấp thành NH_4^+/NH_3 do việc thu mẫu xác định vi khuẩn và lấy mẫu nước được thực hiện trong cùng một thời gian.

Bảng 3: Biến động hàm lượng TAN (mg/L) trong 10 ngày thí nghiệm

Độ mặn (%)	Ngày thí nghiệm				
	1	3	5	7	10
15	0,25±0,07 ^b	0,65±0,07 ^b	1,00±0,14 ^d	1,25±0,07 ^d	1,55±0,07 ^d
80	0,15±0,07 ^b	0,35±0,07 ^a	0,70±0,14 ^c	0,80±0,14 ^c	0,90±0,14 ^c
85	0,15±0,07 ^b	0,30±0,14 ^a	0,55±0,07 ^{bc}	0,65±0,07 ^{bc}	0,75±0,07 ^{bc}
90	0,00±0,00 ^a	0,25±0,07 ^a	0,40±0,14 ^{ab}	0,55±0,07 ^b	0,65±0,07 ^b
95	0,00±0,00 ^a	0,15±0,07 ^a	0,25±0,07 ^a	0,25±0,07 ^a	0,25±0,07 ^a
100	0,00±0,00 ^a	0,15±0,07 ^a	0,15±0,07 ^a	0,15±0,07 ^a	0,15±0,07 ^a

Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Ở độ mặn 15‰ thì hàm lượng TAN ngày càng tăng cao, có thể do ở độ mặn thấp vi khuẩn phát triển mạnh hơn, quá trình phân hủy vật chất hữu cơ sang $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ càng nhiều hơn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu bổ sung các dòng vi khuẩn có lợi phân lập trong ao nuôi tôm sú trong thời gian 40 ngày của Phạm Thị Tuyết Ngân và ctv. (2011), các tác giả ghi nhận hàm lượng TAN tăng nhanh vào tuần thứ nhất và ổn định vào các tuần tiếp theo.

Hàm lượng NO_2^- có giá trị bằng 0 ở tất cả các nghiệm thức và trong suốt quá trình thí nghiệm. Có thể do thời gian của thí nghiệm ngắn và vi khuẩn *Bacillus* chỉ kịp chuyển hóa đạm hữu cơ tạo ra NH_4^+ , trong khi đó với khoảng thời gian quá ngắn và thể tích nuôi tương đối nhỏ thì nhóm vi khuẩn nitrate hóa chưa thể phát triển và sử dụng NH_4^+ để thực hiện quá trình nitrite hóa sinh ra NO_2^- . Giải thích cho vấn đề này trong nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân và ctv. (2011) cho rằng càng về cuối thời gian thí nghiệm thì nhóm vi khuẩn nitrate hóa mới phát triển để sử dụng TAN làm nguyên liệu cho quá trình chuyển hóa đạm, do đó hàm lượng TAN tăng nhanh vào 7 ngày đầu thí nghiệm và sau đó ổn định dần.

Bảng 4: Biến động mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* (Log CFU/mL)

Độ mặn (‰)	Ngày thí nghiệm				
	1	3	5	7	10
15	4,28±0,01 ^c	5,14±0,02 ^c	4,83±0,05 ^c	3,93±0,02 ^c	3,20±0,01 ^c
80	3,88±0,03 ^d	3,98±0,01 ^d	4,18±0,02 ^d	3,73±0,01 ^d	3,11±0,02 ^d
85	3,70±0,04 ^c	3,86±0,04 ^c	4,10±0,02 ^c	3,64±0,05 ^c	3,07±0,02 ^c
90	3,63±0,04 ^c	3,76±0,04 ^c	4,03±0,02 ^c	3,50±0,06 ^b	3,02±0,01 ^b
95	3,02±0,01 ^b	2,68±0,04 ^b	2,08±0,05 ^b	0 ^a	0 ^a
100	2,42±0,02 ^a	2,00±0,06 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

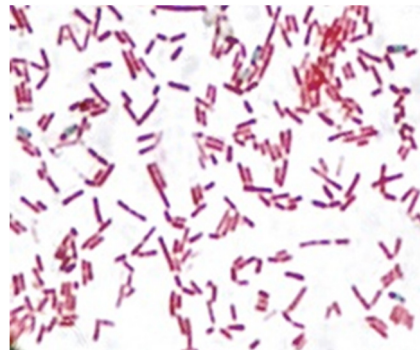
Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Những giá trị bằng 0 biểu thị không có khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy

Mật độ vi khuẩn được tính toán và bổ sung bằng nhau vào các nghiệm thức thí nghiệm, tuy nhiên do việc lấy mẫu được thực hiện sau khi bổ sung vi khuẩn 2 giờ do đó có sự khác biệt về mật độ vi khuẩn giữa các nghiệm thức ($p < 0,05$) ở ngày bắt đầu thí nghiệm. Mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* giảm dần khi độ mặn tăng dần. So với 95‰ và 100‰ thì độ mặn 15‰ và 80‰, 85‰ và 90‰ có mật độ vi khuẩn cao hơn, thời gian thích ứng của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* tương đối nhanh hơn, mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* ổn định qua các lần thu mẫu. Ngoại trừ độ mặn 95‰ và 100‰, mật độ vi khuẩn ở các độ mặn thấp hơn đều tăng từ ngày 1 đến ngày 5 và sau đó giảm ở ngày thứ 7 và 10 (Bảng 4). Kết

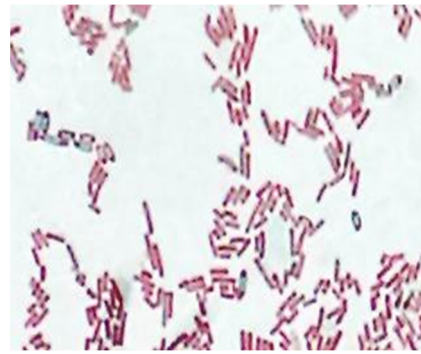
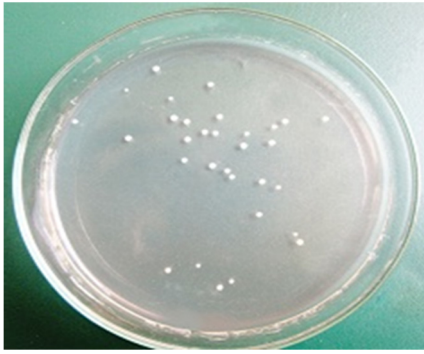
quả này cho thấy rằng độ mặn 90‰ là độ mặn cao nhất mà vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có thể phát triển và độ mặn này được chọn để thực hiện Thí nghiệm 2 tiếp theo.

3.1.2 Kết quả nhuộm Gram bào tử

Hình 1 và 2 chứng minh khả năng tồn tại, phát triển và khả năng sinh bào tử của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* ở độ mặn 15‰ và 90‰. Khuẩn lạc *Bacillus* ở độ mặn 15‰ có kích thước lớn hơn so với ở 90‰, hình tròn, màu trắng đục, bề mặt nhẵn tạo thành màng mịn lan trên bề mặt thạch. Bào tử *Bacillus* hình bầu dục, ở độ mặn 90‰ bào tử phình to nhưng ngắn hơn so với độ mặn 15‰.



Hình 1A: Khuẩn lạc *Bacillus* ở độ mặn 15‰ Hình 1B: Bào tử *Bacillus* ở độ mặn 15‰ (vật kính 100×)



Hình 2A: Khuẩn lạc *Bacillus* ở độ mặn 90‰ Hình 2B: Bào tử *Bacillus* ở độ mặn 90‰ (vật kính 100×)

3.2 Nghiên cứu sự phát triển và ảnh hưởng của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trong môi trường nuôi *Artemia* ở độ mặn cao

Nhiệt độ ở tất cả các nghiệm thức ít biến động và không khác biệt nhau ($p > 0,05$), trung bình $26,7 \pm 0,8$ °C vào buổi sáng và $30,2 \pm 0,6$ °C vào buổi chiều. De Los Santos *et al.* (1980) cho rằng nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của *Artemia* từ 22-35 °C. Nhiệt độ quá thấp (≤ 20 °C) *Artemia* sẽ sinh trưởng chậm hoặc chết rải rác và ngược lại nhiệt độ quá cao (≥ 36 °C) cũng gây ra hiện tượng chết rải rác hoặc có thể chết hàng loạt, làm giảm khả năng sinh sản và sự phục hồi của quần thể (Nguyễn Văn Hòa và *ctv.*, 2005).

pH dao động từ 7,9-8,25 và không khác biệt giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$). Theo Browne *et al.* (1991) pH thích hợp để *Artemia* phát triển tốt là 7-8,5. Theo Chanratchakool (2003) cần khống chế

pH dưới 8,3 nhằm đảm bảo sự cân bằng ion của độ kiềm trong các ao nuôi giáp xác. Như vậy, khoảng pH trong nghiên cứu này là an toàn cho *Artemia* trong quá trình thí nghiệm.

NH_4^+ có xu hướng tăng từ ngày 1 đến ngày 10 của quá trình thí nghiệm nhưng giảm vào ngày thứ 15 ở tất cả các nghiệm thức. Ở nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn thì hàm lượng NH_4^+ thấp hơn so với các nghiệm thức KĐ+Bac và CĐ+Bac (Bảng 5). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân và Trần Sương Ngọc (2014) khi ghi nhận hàm lượng TAN ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefascines* (B41) cao hơn nhiều so với nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn. Các tác giả cho rằng chủng vi khuẩn này đã phát huy được vai trò trong việc phân hủy vật chất hữu cơ trong bể nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*).

Bảng 5: Biến động giá trị pH, TAN và NO_2^- trong các nghiệm thức

Chỉ tiêu	Nghiệm thức	Ngày thí nghiệm			
		1	5	10	15
pH	KĐ	8,15±0,07 ^a	8,25±0,07 ^a	8,15±0,07 ^a	8,05±0,07 ^a
	CĐ	8,10±0,14 ^a	8,15±0,07 ^a	8,05±0,07 ^a	7,90±0,00 ^a
	KĐ+Bac	8,15±0,07 ^a	8,20±0,00 ^a	8,10±0,00 ^a	8,00±0,14 ^a
	CĐ+Bac	8,10±0,00 ^a	8,15±0,07 ^a	8,05±0,07 ^a	7,90±0,00 ^a
TAN (mg/L)	KĐ	0,10±0,00 ^a	0,35±0,07 ^a	1,20±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a
	CĐ	0,20±0,00 ^{ab}	0,50±0,00 ^b	1,45±0,07 ^b	1,25±0,07 ^b
	KĐ+Bac	0,10±0,00 ^a	0,95±0,07 ^c	1,30±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a
	CĐ+Bac	0,25±0,07 ^b	1,10±0,00 ^d	1,55±0,07 ^b	1,30±0,00 ^b
NO_2^- (mg/L)	KĐ	0,00±0,00 ^a	0,15±0,07 ^a	0,45±0,07 ^a	0,30±0,00 ^a
	CĐ	0,00±0,00 ^a	0,10±0,00 ^a	0,30±0,0 ^{ab}	0,20±0,00 ^a
	KĐ+Bac	0,00±0,00 ^a	0,35±0,07 ^b	0,55±0,07 ^b	0,40±0,00 ^b
	CĐ+Bac	0,00±0,00 ^a	0,25±0,07 ^{ab}	0,55±0,07 ^b	0,25±0,07 ^a

Các giá trị trong cùng một cột của cùng một chỉ tiêu môi trường có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Các nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có hàm lượng NO_2^- thấp hơn các nghiệm thức được bổ sung vi khuẩn. Mặt khác,

trong cùng một điều kiện có hoặc không có bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* thì hàm lượng NO_2^- ở nghiệm thức có bùn đáy thấp hơn nghiệm

thức không có bùn đáy, mặc dù khác biệt không có ý nghĩa ($p>0,05$). Huỳnh Hữu Điền và ctv. (2015) ghi nhận tổng đạm amon (TAN) ở 2 nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* (B41) và *Bacillus subtilis* (B67) không khác biệt nhau ($p>0,05$) nhưng luôn cao hơn so với đối chứng (không bổ sung vi khuẩn). Các tác giả cho rằng việc bổ sung vi khuẩn B67 và B41 đã có tác dụng làm tăng quá trình amon hóa từ đó làm hàm lượng TAN tăng đáng kể trong các bể nuôi tôm thẻ chân trắng. Hàm lượng TAN và NO₂ trong nghiên cứu này nằm trong khoảng an toàn cho *Artemia*. Nghiên cứu của Ngô Thị Thu Thảo và ctv. (2015) cho thấy khi nuôi *Artemia* ở độ mặn 90‰ thì hàm lượng TAN và NO₂ vào ngày thứ 5 là 1,08±0,12 mg/L và 1,04±0,26 mg/L tăng lên vào ngày thứ 15 là 1,13±0,06 mg/L và 1,08±0,00 mg/L nhưng

Artemia vẫn sinh trưởng bình thường.

Mật độ vi khuẩn *Bacillus* trong nước ở hai nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* tương đối ổn định ở ngày 1, giảm ở ngày thứ 5 và sau đó tăng dần lên ở ngày thứ 10 và 15. Nghiệm thức không bùn đáy có mật độ vi khuẩn trong nước luôn cao hơn nghiệm thức có bùn đáy (Bảng 6). Ở nghiệm thức có bùn đáy + bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* mật độ ngày 10 là 3,42±0,08 log CFU/mL và tăng nhẹ vào ngày 15 (3,58±0,02 log CFU/mL). Các nghiệm thức không được bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* không phát hiện vi khuẩn này trong bùn đáy từ ngày 1 đến 15. Kết quả cho thấy ở độ mặn 90‰ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* cần thời gian khoảng 10 ngày để xâm nhập và phát triển trong nền đáy của môi trường nuôi.

Bảng 6: Biến động mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trong nước và trong bùn (Log CFU/mL)

	Nghiệm thức	Ngày thí nghiệm			
		1	5	10	15
Trong nước	KĐ	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	CĐ	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	KĐ+Bac	4,95±0,04 ^c	3,57±0,06 ^c	3,88±0,04 ^c	4,07±0,02 ^c
	CĐ+Bac	4,59±0,00 ^b	3,35±0,01 ^b	3,71±0,02 ^b	3,90±0,01 ^b
Trong bùn	CĐ	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	CĐ+Bac	0 ^a	0 ^a	3,42±0,08 ^b	3,58±0,02 ^b

Các giá trị trong cùng một cột của cùng một chỉ tiêu có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Những giá trị bằng 0 biểu thị không có khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy.

Hàm lượng TOM ở nghiệm thức CĐ+Bac giảm vào ngày cuối của quá trình thí nghiệm (4,55±0,23%) và khác biệt ($p<0,05$) so với nghiệm thức CĐ (7,32±0,23%). Kết quả cho thấy mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trong bùn tăng dần theo thời gian nuôi làm cho quá trình phân hủy chất hữu cơ diễn ra nhanh hơn nên hàm lượng chất hữu cơ có xu hướng giảm theo thời gian (Bảng 7). Huỳnh Hữu Điền và ctv. (2015) bổ sung các dòng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* (B41) và *Bacillus subtilis* (B67) vào các bể nuôi tôm thẻ chân trắng, sau 30 ngày trở đi thì TSS ở 2 nghiệm thức B67 và B41 gần như tương đương nhau ($p>0,05$) và thấp hơn ($p<0,05$) so với đối chứng (không bổ sung vi khuẩn). Các tác giả cho rằng vi khuẩn *Bacillus* B67 và B41 đã phân hủy nhanh hợp chất hữu cơ và làm giảm đáng kể lượng chất hữu cơ trong nước. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Phạm Thị Tuyết Ngân (2011) khi dùng vi khuẩn *Bacillus* B67, B41 và B9 với mật độ 10⁶ CFU/mL để bổ sung vào bể nuôi tôm sú thương phẩm thì hàm lượng TSS sau 90 ngày ở nghiệm thức đối chứng (368 mg/L) cao hơn so với bổ sung B67 (237 mg/L) hoặc B41 (305 mg/L).

Bảng 7: Hàm lượng TOM trong bùn đáy của các nghiệm thức (%)

Nghiệm thức	Ngày 1	Ngày 15
CĐ	7,77±0,36 ^a	7,32±0,23 ^a
CĐ+Bac	7,41±0,06 ^a	4,55±0,23 ^b

Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$)

Tỷ lệ sống của *Artemia* có sự khác biệt ($p<0,05$) giữa nghiệm thức bổ sung và không bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens*, cụ thể ngày 10 ở nghiệm thức CĐ là 65,8±1,53% và nghiệm thức CĐ+Bac là 75,2±1,04%. Việc bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trực tiếp vào môi trường đã làm cho *Artemia* đạt tỷ lệ sống cao hơn một cách có ý nghĩa ($p<0,05$) so với các nghiệm thức khác (Bảng 8). Tỷ lệ sống ở hai nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* tương đương với nghiên cứu của Nguyễn Thị Kim Phượng (2012), trong đó *Artemia* được nuôi bằng các loại thức ăn gồm tảo *Chaetoceros*, cám ủ men và thức ăn tôm sú số 0 đạt tỷ lệ sống từ 75,4 đến 85,6% sau 10 ngày nuôi. *Artemia* có thể ăn nhiều loại thức ăn khác nhau với kích cỡ các hạt dao động trong

khoảng 25-50 μm (Dobbeleir *et al.*, 1980). 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 góp phần nâng cao tỷ lệ sống của chúng (Ngô Thị Thu Thảo *et al.*, 2015).

Bảng 8: Tỷ lệ sống của *Artemia* trong các nghiệm thức thí nghiệm (%)

Nghiệm thức	Ngày thí nghiệm			
	1	5	10	15
KĐ	100±0,00 ^a	83,5±1,00 ^a	67,7±1,76 ^a	59,3±1,26 ^b
CĐ	100±0,00 ^a	82,5±1,00 ^a	65,8±1,53 ^a	56,2±1,53 ^a
KĐ+Bac	100±0,00 ^a	89,3±1,61 ^b	79,5±1,00 ^c	74,8±1,61 ^d
CĐ+Bac	100±0,00 ^a	90,0±1,50 ^b	75,2±1,04 ^b	68,2±1,53 ^c

Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Vào ngày nuôi thứ 9, *Artemia* có hiện tượng bắt cặp ở nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* và sớm hơn so với nghiệm thức không được bổ sung vi khuẩn này ($p < 0,05$). Tỷ lệ bắt cặp ở nghiệm thức KB+Bac và CĐ+Bac lần lượt là 83,3±6,36% và 80,3±6,90% vào ngày nuôi thứ 15 và cao hơn nhiều ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức không được bổ sung vi khuẩn (Bảng 9).

Bảng 9: Tỷ lệ bắt cặp của *Artemia* (%) trong các nghiệm thức thí nghiệm

Nghiệm thức	Ngày thí nghiệm			
	1	5	10	15
KĐ	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
CĐ	0 ^a	0 ^a	0 ^a	11,7±2,02 ^a
KĐ+Bac	0 ^a	0 ^a	6,27±3,21 ^b	83,3±6,36 ^b
CĐ+Bac	0 ^a	0 ^a	11,1±3,53 ^c	80,3±6,90 ^b

Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 10: Chiều dài *Artemia* (mm) trong các nghiệm thức theo thời gian

Nghiệm thức	Ngày thí nghiệm			
	1	5	10	15
KĐ	0,48±0,01 ^a	2,86±0,06 ^a	4,19±0,28 ^a	6,09±0,02 ^a
CĐ	0,49±0,01 ^a	2,97±0,10 ^a	4,26±0,07 ^a	6,16±0,06 ^a
KĐ+Bac	0,49±0,01 ^a	3,63±0,23 ^b	6,43±0,17 ^b	7,91±0,18 ^b
CĐ+Bac	0,48±0,01 ^a	3,87±0,25 ^b	6,55±0,06 ^b	8,70±0,04 ^b

Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Chiều dài trung bình của *Artemia* cái khi bắt cặp sinh sản ở ngày thứ 15 lớn nhất ở nghiệm thức CĐ+Bac (9,11±0,16 mm) và khác biệt ($p < 0,05$) so với nghiệm thức KĐ+Bac (Bảng 11). Trung bình chiều dài *Artemia* đực giữa KĐ+Bac và CĐ+Bac không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Ở lứa tuổi trưởng thành con cái có kích thước lớn hơn con đực. Asem and Rastegar-Pouyani (2007) cho rằng kích thước khác nhau giữa con đực và con cái có thể giải thích sự thuận lợi cho giao phối, con cái mang con đực trong suốt quá trình giao phối. Mật độ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* cao hơn trong nền đáy bùn cùng

Chiều dài *Artemia* bắt đầu có sự khác biệt ($p < 0,05$) vào ngày nuôi thứ 5 giữa nghiệm thức không bổ sung và có bổ sung vi khuẩn *B. Amyloliquefaciens*. Khác biệt rõ nhất vào ngày thứ 10 khi chiều dài *Artemia* ở nghiệm thức KĐ và CĐ lần lượt là 4,19±0,28 mm và 4,26±0,07 mm so với KĐ+Bac và CĐ+Bac là 6,43±0,17 mm và 6,55±0,06 mm (Bảng 10). Các kết quả này đều thấp hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Văn Hòa *et al.* (2006) chiều dài *Artemia* đạt 6,81 ± 1,32 mm vào ngày thứ 9 của quá trình nuôi nhưng tương đương với kết quả nghiên cứu của Huynh Thanh Toi *et al.*, (2013) sau 15 ngày nuôi chiều dài *Artemia* là 7,6 mm khi cho ăn tảo *Tetraselmis* sp. Nếu so sánh các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn thì chiều dài của *Artemia* ở nghiệm thức CĐ+Bac (8,70±0,04 mm) dài hơn so với nghiệm thức KĐ+Bac (7,91±0,18 mm), tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

với quá trình chuyển hóa chất hữu cơ tốt hơn có thể đã làm phong phú thêm nguồn thức ăn và giúp cho quá trình dinh dưỡng của *Artemia* hiệu quả hơn.

Sức sinh sản trung bình của *Artemia* cao nhất ở đợt 2, trong đó nghiệm thức CĐ+Bac là 64,9±2,99 phôi cao hơn so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$) (Bảng 12). 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 sức sinh sản của *Artemia* cao hơn so với không bổ sung *Bacillus*. Kết quả nghiên

cứu này cũng tương đương với kết quả của Trần Hữu Lễ và Nguyễn Văn Hòa (2013) khi sử dụng cám gạo ủ men và thức ăn tôm sú trong ao nuôi *Artemia* thâm canh thì sức sinh sản ở nghiệm thức bổ sung cám gạo ủ men thấp nhất (42 ± 9 phôi/con cái) và cao nhất (53 ± 18 phôi/con cái) khi sử dụng thức ăn tôm số 0. Tuy nhiên, sức sinh sản của *Artemia* trong thí nghiệm này thấp hơn sức sinh sản của *Artemia* được cho ăn bằng tảo tạt (66 ± 16 phôi/con cái) và tảo thuần *Chaetoceros* sp. (120 ± 48 phôi/con cái) trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Hòa và ctv. (2006).

Tỷ lệ *Artemia* sinh trứng bào xác đạt rất cao qua các đợt thu mẫu, cao nhất ở đợt thu thứ 2 (100% cho cả hai nghiệm thức). Tỷ lệ *Artemia* sinh trứng đạt cao dẫn đến tỷ lệ trứng bào xác (TBX)/tổng số phôi cũng rất cao. Đặc biệt ở đợt thu mẫu thứ 3 tỷ lệ TBX/tổng số phôi ở CĐ+Bac

đạt $95,0 \pm 8,66$ phôi/đợt. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Trần Hữu Lễ và Nguyễn Văn Hòa (2013) với số lượng phôi trứng bào xác trung bình của *Artemia* khi cho ăn bằng cám gạo ủ men ($40,86 \pm 9,51$ phôi/con cái) và cho ăn bằng thức ăn tôm số 0 ($52,90 \pm 16,31$ phôi/con cái).

Bảng 11: Chiều dài *Artemia* đực và cái tham gia sinh sản (mm)

	Nghiệm thức	Ngày thí nghiệm	
		10	15
Con đực	KĐ+Bac	$6,31 \pm 0,03^a$	$7,87 \pm 0,15^a$
	CĐ+Bac	$6,45 \pm 0,16^a$	$8,05 \pm 0,14^a$
Con cái	KĐ+Bac	$7,61 \pm 0,17^a$	$8,63 \pm 0,11^a$
	CĐ+Bac	$7,76 \pm 0,11^a$	$9,11 \pm 0,16^b$

Các giá trị trong cùng một cột của cùng một chỉ tiêu có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Bảng 12: Các chỉ tiêu liên quan đến sinh sản của *Artemia*

Chỉ tiêu	Nghiệm thức	Ngày thí nghiệm			
		13	16	19	22
Sức sinh sản (phôi/con cái)	KĐ+Bac	$19,8 \pm 1,71^a$	$55,5 \pm 2,91^a$	$45,6 \pm 1,11^a$	$19,2 \pm 1,39^a$
	CĐ+Bac	$16,7 \pm 1,29^a$	$64,9 \pm 2,99^b$	$48,3 \pm 2,04^a$	$22,1 \pm 1,36^a$
Tỷ lệ TBX/tổng số phôi (%)	KĐ+Bac	$59,97 \pm 41,41^a$	$100 \pm 0,00^a$	$79,27 \pm 1,46^a$	$80,7 \pm 19,7^a$
	CĐ+Bac	$25,40 \pm 13,31^a$	$100 \pm 0,00^a$	$95,0 \pm 8,66^b$	$78,5 \pm 27,4^a$
Tỷ lệ sinh TBX (%)	KĐ+Bac	$60,0 \pm 40,0^a$	$100 \pm 0,00^a$	$80,0 \pm 0,00^a$	$93,3 \pm 11,5^a$
	CĐ+Bac	$73,3 \pm 11,5^a$	$100 \pm 0,00^a$	$93,3 \pm 11,5^a$	$73,3 \pm 30,6^a$

Các giá trị trong cùng một cột của cùng một chỉ tiêu có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). TBX: Trứng bào xác

Phương thức sinh sản của *Artemia* phụ thuộc vào mức thức ăn, trong điều kiện thức ăn ít, *Artemia* cái có khả năng phát triển cơ chế đẻ trứng bào xác (Mohebbi, 2010). Tuy nhiên, trong thực tế nuôi *Artemia* có rất nhiều yếu tố cùng tác động đến sự thay đổi phương thức sinh sản như thức ăn, độ mặn, nhiệt độ, mật độ quần thể, số lứa đẻ trong chu kỳ sinh sản... Trong một số nghiên cứu về bổ sung chế phẩm sinh học vào môi trường nuôi *Artemia* gần đây thì tỷ lệ sinh trứng bào xác cũng rất biến động. Ngô Thị Thu Thảo và Mã Linh Tâm (2013) thu được tỷ lệ sinh trứng bào xác là 80% tương ứng với việc bổ sung *Bacillus* và *Lactobacillus* vào môi trường nuôi *Artemia* ở độ mặn 30‰. Ngô Thị Thu Thảo và Nguyễn Thị Ngoan (2015) thu được tỷ lệ sinh trứng bào xác là 58,3% khi bổ sung *Bacillus subtilis* đồng thời vào tảo và vào môi trường nuôi, nhưng tỷ lệ này tăng lên đến 100% khi chỉ bổ sung *B. subtilis* vào môi trường nuôi *Artemia*. Bổ sung chế phẩm sinh học có chứa nhóm vi khuẩn *Bacillus* vào môi trường nuôi *Artemia* vừa tạo nguồn thức ăn, vừa có thể hỗ trợ tiêu hóa thức ăn vì bản thân vi khuẩn chứa các loại enzyme tiêu hóa (Sugita et al., 1997). Tuy nhiên, khi xuất hiện trong môi trường nuôi *Artemia* với mật độ cao, vi khuẩn *Bacillus* có

thể là nguyên nhân tạo áp lực về không gian sống hoặc bản thân chúng tiết ra những chất hóa học (Williams and Vickers, 1986; Sugita et al., 1997) có khả năng dẫn tới những điều chỉnh tập tính sinh sản của *Artemia*. Nghiên cứu về mối liên hệ giữa vi khuẩn với đặc điểm sinh học sinh sản của *Artemia* cần được thực hiện để có thể ứng dụng trong thực tế nghề nuôi.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* có khả năng tồn tại và phát triển ở độ mặn 90‰.

Ở độ mặn 90‰, việc bổ sung vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* vào môi trường nuôi đã làm giảm hàm lượng chất hữu cơ trong nền đáy, tăng chiều dài, tỷ lệ sống, tỷ lệ bắt cặp và sức sinh sản của *Artemia franciscana*.

4.2 Đề xuất

Thực hiện thêm các nghiên cứu về ảnh hưởng của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trên *Artemia* với quy mô lớn hơn để tìm hiểu khả năng ứng dụng trong thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdelkarim, M., H. Besma, E.M. Angeles, C. Kamel, K. Fathi and B. Amina. 2010. Using mixture design to construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*. Bio-control Science and Technology. Vol. 20 (9-10): Pp. 983-996.
- Asem A. and Rastegar-Pouyani N. 2007. Sexual Dimorphism in *Artemia urmiana* (Gunther, 1899) (Anostraca: Artemiidae) from the Urmia Lake, West Azerbaijan, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances 6 (12): Pp. 1409-1415.
- Briggs M.R.P. and Funge-Smith C.S. 1994. A nutrient budget of some intensive marine ponds in Thailand. Aquaculture Fisheries Management 24: Pp. 789 – 811.
- Browne R.A., Sorgeloos P. and Trotman C.N.A. 1991. *Artemia* biology, CRC press. Inc, Printed in United State: 384 pages.
- Chanratchakool, P., J.F. Turnbull, S.J. Funge-Smith, I.H. Macrae and C. Limsuwan, 2003. Quản lý sức khỏe tôm trong ao nuôi. Tái bản lần thứ 4. Người dịch: Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Thanh Phương, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trần Ngọc Hải. Danida-Bộ Thủy sản: 153 trang.
- De Los Santos Jr.C., Sorgeloos P., Bernardino A. and Laviña E.M. 1980. Successful inoculation of *Artemia* and production of cysts in man-made salterns in the Philippines. In G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, & E. Jaspers (Eds.), The Brine Shrimp *Artemia*. Proceedings of the International Symposium on the brine shrimp *Artemia salina*, Corpus Christi, Texas, USA, August 20-23, 1979. (Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, pp. 159–163). Wetteren, Belgium: Universa Press.
- Huỳnh Hữu Điền, Phạm Thị Tuyết Ngân và Trương Quốc Phú. 2015. Ảnh hưởng của các dòng vi khuẩn *Bacillus* đến sinh trưởng, tỷ lệ sống và các yếu tố môi trường trong bể nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ số 36/2015 (Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học). ISSN: 1859-2333: Trang 98-106.
- Huỳnh Thanh Toi, Boeckx P., Sorgeloos P., Bossier P. and Van Stappen G. 2013. Bacteria contribute to *Artemia* nutrition in algae-limited conditions: A laboratory study. Aquaculture 7: Pp. 388-391.
- Mohebbi F. 2010. The brine shrimp *Artemia* and hypersaline environments microalgal composition: a mutual interaction. International journal of aquatic science. Vol. 1(1): Pp. 19-27.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164(1): Pp. 351-358.
- 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.
- 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.
- Ngô Thị Thu Thảo, Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Thị Bảo Trang. 2015. Ảnh hưởng kết hợp của độ mặn và việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* đến sinh trưởng và sinh sản của *Artemia franciscana*. Tạp chí Khoa học ĐH Cần Thơ số 39B/2015 (Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học). ISSN: 1859-2333: Trang 118-127.
- Nguyễn Thị Kim Phượng. 2012. Nghiên cứu ảnh hưởng của thức ăn, độ mặn và nhiệt độ đến tỉ lệ sống và một số chỉ tiêu sinh sản của *Artemia franciscana* (đòng Vĩnh Châu). Luận văn Thạc sĩ. Trường Đại học Cần Thơ: 85 trang.
- Nguyễn Văn Hòa, Huỳnh Thanh Tới, Nguyễn Thị Hồng Vân, Dương Thị Mỹ Hạnh. 2006. Ảnh hưởng của tảo *Chaetoceros* sp. lên chất lượng *Artemia* sinh khối. Tạp chí Nghiên cứu Khoa học Trường Đại học Cần Thơ: Trang 62-73.
- Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Hồng Vân, Trần Thị Thanh Hiền, Trần Sương Ngọc và Trần Hữu Lễ. 2005. Nâng cao hiệu quả của việc nuôi sinh khối *Artemia* trên ruộng muối. Báo cáo khoa học. Đề tài cấp Bộ. Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ: 63 trang.
- Nguyen Van Hoa. 1993. Effect of environment conditions on the quantitative feed requirements of the brine shrimp *Artemia franciscana* (Kellogg). University of Ghent. Thesis of Master of Science in Aquaculture.
- 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. Số chuyên đề Thủy sản (2): Trang 184-191.
- Phạm Thị Tuyết Ngân, 2011. Nghiên cứu quần thể vi khuẩn chuyển hóa đạm trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*). Luận án tiến sĩ. Trường Đại học Cần Thơ.
- Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Ngọc Út, Trương Quốc Phú và Nguyễn Hữu Hiệp. 2011. Ảnh hưởng của vi khuẩn hữu ích lên các yếu tố môi trường và tôm sú (*Penaeus monodon*) nuôi trong bể. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số 20b: Trang 59-68.
- Sugita, H., N. Matsuo, Y. Hirose, M. Iwato and N. Deguchi, 1997. *Vibrio* sp. strain NMIO, isolated

- from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. Appl. Environ. Microbiol., 63: 4986-4989.
- Trần Hữu Lễ và Nguyễn Văn Hòa. 2013. Hiệu quả của cám gạo ủ men và thức ăn tôm sú trong ao nuôi *Artemia* thâm canh. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ số 25/2013 (Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học). ISSN: 1859-2333: Trang 132-141.
- Verschuere, L., H. Heang, G. Criel, S. Dafnis, P. Sorgeloos, and W. Verstraete., 2000. Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 66: Pp. 1139-1146.
- Williams, S.T. and J.C. Vickers, 1986. The ecology of antibiotic production. Microb. Ecol., 12: 43-52.