



DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.001

ẢNH HƯỞNG CỦA PROBIOTIC (*Bacillus subtilis*) LÊN CHẤT LƯỢNG NƯỚC, TỈ LỆ SỐNG VÀ HOẠT TÍNH ENZYME TIÊU HÓA CỦA ẤU TRÙNG CUA BIỂN (*Scylla paramamosain*)

Trần Nguyễn Duy Khoa*

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Nguyễn Duy Khoa (email: tndkhoa@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 08/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

Effect of probiotic (*Bacillus subtilis*) on water quality, survival rate and digestive enzyme activities of mud crab larvae (*Scylla paramamosain*)

Từ khóa:

Bacillus subtilis, cua biển, chất lượng nước, enzyme tiêu hóa

Keywords:

Bacillus subtilis, water quality, digestive enzyme, mud crab

ABSTRACT

Probiotic is extensively used in aquaculture for enhancement of water quality, disease control, and immune system of aquatic organisms. This study was carried out to determine the effectiveness of the probiotic (*Bacillus subtilis*) as a water additive in mud crab (*Scylla paramamosain*) larviculture. *Bacillus subtilis* was weekly added at 10^6 CFU/mL and control treatment without probiotic. The result showed that probiotic could help to improve the water quality as TAN, nitrite, and *Vibrio* density were significantly lower compared to the control treatment ($p < 0,05$). The larval stage index (LSI) and survival rate of the larvae were statistically enhanced over the control ($p < 0,05$). Digestive enzyme activities including protease, trypsin, pepsin, and amylase were significantly increased from Zoea 1 to Zoea 5 ($p < 0,05$). This investigation showed that *Bacillus subtilis* was appropriate for application in mud crab larvae culture to enhance the survival rate, LSI, and digestive enzyme activities, improve the water quality and diseases control of mud crab larvae.

TÓM TẮT

Probiotic được sử dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản để cải thiện chất lượng nước, kiểm soát dịch bệnh và tăng cường hệ thống miễn dịch của các động vật thủy sinh. Nghiên cứu này được tiến hành để xác định hiệu quả của vi khuẩn *Bacillus subtilis* như một chất bổ sung trong quá trình ương ấu trùng cua biển (*Scylla paramamosain*). *Bacillus subtilis* được bổ sung hàng tuần với mật độ 10^6 CFU/mL và nghiệm thức đối chứng không sử dụng probiotic. Kết quả cho thấy rằng, probiotic có thể giúp cải thiện chất lượng nước như hàm lượng TAN, nitrit và mật độ *Vibrio* thấp hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Chỉ số biến thái (LSI) và tỉ lệ sống của ấu trùng được nâng cao về đáng kể so với khi không sử dụng probiotic ($p < 0,05$). Các hoạt tính của các enzyme tiêu hóa bao gồm Protease, Trypsin, Pepsin và Amylase đã tăng đáng kể từ giai đoạn Zoea 1 đến Zoea 5 ($p < 0,05$). Nghiên cứu này cho thấy *Bacillus subtilis* thích hợp để ứng dụng trong ương nuôi ấu trùng cua biển để nâng cao tỉ lệ sống, tỉ lệ biến thái ấu trùng và hoạt tính của các enzyme tiêu hóa, cải thiện chất lượng nước và kiểm soát dịch bệnh trên ấu trùng cua biển.

Trích dẫn: Trần Nguyễn Duy Khoa, 2018. Ảnh hưởng của probiotic (*Bacillus subtilis*) lên chất lượng nước, tỉ lệ sống và hoạt tính enzyme tiêu hóa của ấu trùng cua biển (*Scylla paramamosain*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(1): 1-8.

1 GIỚI THIỆU

Cua biển (*Scylla paramamosain*) loài đối tượng thủy sản có giá trị kinh tế cao vào được nuôi ở nhiều nơi trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Những năm gần đây, diện tích nuôi cua biển ngày càng mở rộng dẫn đến nguồn giống cua biển từ tự nhiên đang giảm mạnh do việc khai thác quá mức để cung cấp cho nghề nuôi (Nyqvist, 2011). Bên cạnh đó, việc phát triển công nghệ trại giống cho mục đích sản xuất giống cua biển ở quy mô thương mại cũng được tập trung nghiên cứu. Tuy nhiên, vẫn đề khó khăn nhất hiện nay là tỉ lệ sống của ấu trùng còn thấp (Lindner, 2005). Nhiều nguyên nhân được nêu ra như: nhiễm khuẩn từ cua mẹ và môi trường (Talpur *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2016), chất lượng nước (Li *et al.*, 2012) hay đặc điểm dinh dưỡng (Pavasovic, 2004; Holme, 2008).

Song song đó, các loại kháng sinh và thuốc diệt khuẩn đã và đang được sử dụng rộng rãi trong sản xuất thủy sản ở trại giống hay trang trại (Gomez *et al.*, 2000) để kiểm soát bệnh trên đối tượng nuôi, dẫn đến việc hình thành các dòng vi khuẩn kháng thuốc (Zhang, Li, and Sun, 2011) gây ảnh hưởng lớn đến nuôi trồng thủy sản và các khía cạnh xã hội (Mezhoud *et al.*, 2016). Gần đây, probiotic được ứng dụng vào thủy sản được xem như là một giải pháp đột phá trong sản xuất thủy sản (Browdy, 1998). Probiotic được báo cáo với hiệu quả vượt trội trong việc ức chế các mầm bệnh vi khuẩn ở cá (Mandiki *et al.*, 2011; Janarthanam *et al.*, 2012), tăng cường khả năng tiêu hóa trên tôm thẻ chân trắng và tôm càng xanh (Zokaifar *et al.*, 2012; Sumon *et al.*, 2018), kích thích miễn dịch trên cá, tôm (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014; Banerjee and Ray, 2017) và cải thiện chất lượng môi trường nước nuôi (Nimrat *et al.*, 2012; Talpur *et al.*, 2013). Trong bối cảnh hiện nay, nếu yêu cầu thực hành canh tác hiệu quả và thân thiện với môi trường được đặt lên hàng đầu thì probiotic ngày càng được sử dụng rộng rãi hơn (Wang, Li, and Lin, 2008).

Đã có nhiều nghiên cứu đánh giá tác dụng của probiotic lên sự phát triển và miễn dịch ở động vật thủy sản như cá (Yarahmadi *et al.*, 2016; Munir *et al.*, 2018), tôm (Zokaifar *et al.*, 2012; Sumon *et al.*, 2018), nhuyễn thể (Prado, Romalde, and Barja, 2010; Thảo *et al.*, 2012; Saebom, 2016); nhưng có rất ít thông tin về việc ứng dụng probiotic trong quá trình ương ấu trùng cua biển (Talib *et al.*, 2017). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của probiotic (*Bacillus subtilis*) lên chất lượng nước ương, tỉ lệ sống và hoạt tính enzyme tiêu hóa của ấu trùng cua biển (*Scylla paramamosain*).

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành tại trại thực nghiệm AKUATROP, Đại học Malaysia Terengganu. Cua mẹ được cắt mắt và nuôi vỗ trong hệ thống tuần hoàn với thức ăn là sò huyết. Sau khi đẻ trứng, cua được chuyển sang bể ấp 100 L và thay 100% nước hàng ngày cho đến khi trứng nở. Ấu trùng cua hướng quang mạnh sẽ được thu và sử dụng cho thí nghiệm. Nghiên cứu sử dụng nước biển có độ mặn 30 ppt, được xử lý bằng đèn UV và EDTA (10 g/m³), độ kiềm được duy trì ở mức 100-120 mg/L bằng NHCO₃.

Ấu trùng cua được bố trí vào các bể composite 0.5 m³, có sục khí đều và liên tục với mật độ 400 ấu trùng/lít. Khi cua đạt giai đoạn Zoea 4, mật độ được giảm xuống còn 50 ấu trùng/lít. Thí nghiệm được tiến hành với 2 nghiệm thức: không sử dụng probiotic (đối chứng) và sử dụng *Bacillus subtilis* probiotic (10⁶ CFU/mL) được lặp lại 3 lần. Ấu trùng cua được cho ăn bằng Artemia (từ Zoea 1 đến Zoea 2 cho ăn Artemia bung dù, từ Zoea 3 cho ăn Artemia nở) và định kỳ thay 25% nước 3 ngày/lần. Đối với nghiệm thức sử dụng probiotic, *Bacillus subtilis* (Genchem polytase, Taiwan) được bổ sung vào bể nuôi hàng tuần với hàm lượng 10⁶ CFU/mL. Hàm lượng vi khuẩn được xác định bằng máy quang phổ ở mức OD=630 nm.

2.2 Theo dõi và thu mẫu

Môi trường nước. Nhiệt độ và pH được đo hàng ngày bằng YSI (Fisher scientific) lúc 7g30 và 14g, TAN và nitrite được thu mẫu 4 ngày/lần và phân tích theo phương pháp của Zhou, Wang, and Li (2009). Mật độ vi khuẩn tổng và vibrio được xác định theo phương pháp mô tả của Talpur *et al.* (2013). Độ kiềm được xác định 3 ngày/lần bằng test SERA (Đức).

Tỉ lệ sống và biến thái của ấu trùng. Được xác định tại các giai đoạn Zoea 4, Megalope và Cua 1 theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ sống (\%)} = \left(\frac{\text{Ấu trùng còn sống}}{\text{Ấu trùng ương ban đầu}} \right) \times 100$$

Chỉ số biến thái (Larval Stage Index = LSI):

$$\text{LSI} = \frac{[(N_1 \times n_1) + (N_2 \times n_2) + (N_i \times n_i)]}{(n_1 + n_2 + n_i)}$$

Trong đó: N₁, N₂, N_i: giai đoạn ấu trùng;

n₁, n₂, n_i: số ấu trùng ở giai đoạn tương ứng.

Hoạt tính enzyme tiêu hóa. Việc thu mẫu ấu trùng được tiến hành vào buổi sáng sau khi cho ăn 2 giờ. Mẫu ấu trùng sẽ được thu 7 lần theo mỗi giai đoạn biến thái cho đến khi ấu trùng đạt đến giai đoạn Cua-1 thì kết thúc. Thu ngẫu nhiên mỗi bể 300 mg,

rửa lại bằng nước sạch, thấm hết nước rồi cho vào ống tube 1,5 mL trữ ở nhiệt độ âm 20°C đến khi bắt đầu phân tích. Mẫu ấu trùng của biển (100 mg/mẫu) sẽ được nghiền trong ống nghiệm Eppendorf tiết trùng, sau đó ly tâm 10,000 vòng/phút trong 10 phút, dùng pipet hút dịch nổi chuyển sang ống nghiệm khác, loại bỏ phần xác và tiến hành đo hoạt tính của từng loại enzyme (Pavasovic *et al.*, 2004).

Xác định hoạt tính Protease. Trong ấu trùng của từ Z1 đến C1: chuẩn bị dung dịch đệm gồm 0.3 mL 1% Casein, 0,5 mL 0,1 M Tris-HCl pH 7,0-9,0 buffer và 0,3 mL enzyme ly trích rồi ủ 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó thêm 0,5 mL Trichloroacetic acid TCA, 12% w/v để dừng các phản ứng của enzyme, giữ mẫu ở 37°C trong 48 giờ, sau đó ly tâm 8000 vòng/phút trong 15 phút, cuối cùng đem mẫu đo ở bước sóng 280 nm (Alexander *et al.*, 2002).

Xác định hoạt tính Trypsin. Trypsine được đo theo phương pháp của Tseng *et al.* (1982). Dung dịch đệm pH=8,2: Tris HCl: 50 mL và CaCl₂ 20 mM BAPNA 0,1 M (Na-Benzoyl-D_L Arginine P-nitroanilide (B4875)): 10,87 mg/250 μL DMSO. Dung dịch BAPNA được ủ ở 25°C trong suốt quá trình phân tích mẫu.

Xác định hoạt tính Pepsin. Pepsin được đo theo phương pháp của Worthington (1982) và (Suzer *et al.*, 2007). Ống nghiệm Eppendorf được dùng để lấy 100 μL dung dịch ly trích ủ ở 37°C với 500 μL haemoglobin làm chất đệm, (2% w/v haemoglobin trong 0,06 HCl). Sau 10 phút, dừng phản ứng bằng cách thêm 1 μL trichloroacetic acid (TCA) 5%. Mẫu

được đo ở bước sóng 280 nm. Mẫu đối chứng là dung dịch ly trích ủ sau 10 phút và thêm TCA, mẫu đo là dung dịch ly trích sau khi ủ, thêm TCA rồi đem ly tâm ở 4000 vòng/phút trong vòng 6 phút.

Số liệu sẽ được thể hiện bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, phân tích so sánh thống kê giữa nghiệm thức đối chứng và sử dụng probiotic bằng phần mềm SPSS 24.0 ở mức tin cậy 95%.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chất lượng môi trường nước

Sự biến động của các yếu tố môi trường nước ở các nghiệm thức được thể hiện ở Bảng 1, 2 và 3. Trong suốt quá trình thí nghiệm, nhiệt độ nằm trong khoảng thích hợp cho ấu trùng phát triển, ít biến động mạnh giữa sáng và chiều (từ 27,6 đến 28,5°C). Giá trị pH cũng ít dao động và duy trì trong khoảng thích hợp 7,5 đến 7,8. Độ kiềm được duy trì thường xuyên ở mức 112 đến 115 mg/L. Theo các nghiên cứu trước đây, nhiệt độ nước trong khoảng 26-28°C thích hợp cho ấu trùng của biển, trong đó ở 28°C nhiệt độ là tối ưu, ấu trùng có khả năng thích nghi cao hơn với các biến động về các yếu tố khác như độ mặn hay stress (Nurdiani and Zeng, 2007). Bên cạnh đó, pH từ 6,5 - 9,0 là khoảng thích hợp cho động vật thủy sản (Boyd, 1998) và độ kiềm ở mức 80-120 mg/L là tối ưu cho ấu trùng của biển (Khánh *et al.*, 2015). Nhìn chung các yếu tố nhiệt độ, pH, độ kiềm không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức và duy trì trong khoảng thích hợp cho ấu trùng phát triển.

Bảng 1: Nhiệt độ, pH và độ kiềm trong quá trình thí nghiệm

	Nhiệt độ (°C)		pH		Kiềm (mgCaCO ₃ /L)
	Sáng	Chiều	Sáng	Chiều	
Đối chứng	27,8±0,5	28,4±0,8	7,6±0,3	7,8±0,5	115±18
Probiotic	27,6±0,6	28,5±0,7	7,5±0,4	7,7±0,5	112±15

Sự ảnh hưởng của probiotic lên hàm lượng TAN và Nitrite được thể hiện ở Bảng 2. Ở nghiệm thức đối chứng, TAN dao động từ 0,23 đến 0,52 mg/L trong khi nghiệm thức probiotic, được ghi nhận từ 0,16 đến 0,35 mg/L. Kết quả này cho thấy probiotic giúp giảm hàm lượng TAN thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Tương tự với nitrite, trong khi nghiệm thức probiotic chỉ dao động từ 0,07 đến 0,42 mg/L thì hàm lượng NO₂⁻ ở nghiệm thức đối chứng cao hơn (0,1 đến 0,95 mg/L) có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các độc tố ammonia được ghi nhận là một trong những nguyên nhân phổ biến gây chết động vật thủy sản nhất là ở giai đoạn đầu ấu trùng và trong các hệ thống nuôi mật độ cao (Parra and Yu, 2002). Theo Boyd (1998), hàm lượng TAN thích hợp cho nuôi

tròng thủy sản là 0,2-2 mg/L và hàm lượng nitrite tốt nhất nhỏ hơn 2 mg/L. Probiotic đã được báo cáo là có khả năng loại bỏ nitrogen và photphorus với hàm lượng nhất định bằng cách thúc đẩy quá trình khoáng hóa (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Barak *et al.*, 2003). Kết quả cho thấy, probiotic *Bacillus subtilis* có khả năng làm giảm hàm lượng TAN và nitrite trong nước ương, giúp cải thiện và duy trì chất lượng nước trong khoảng thích hợp. Tác dụng cải thiện chất lượng nước ao nuôi của vi khuẩn *Bacillus subtilis* cũng đã được kiểm chứng bởi Lu *et al.* (2012) với hệ thống tuần hoàn và Muthukrishnan *et al.* (2015) bằng thí nghiệm invitro, kết quả cho thấy hiệu quả khử ammonia tốt từ ngày thứ 5 sau khi thêm vào hệ thống nuôi. Cần theo dõi và kiểm soát chặt chẽ khi hàm lượng TAN và nitrite có xu hướng tăng dần và tăng mạnh vào cuối chu kỳ ương.

Bảng 2: Nồng độ TAN và nitrite giữa nghiệm thức đối chứng và probiotic

	TAN (mg/L)		p- Value	Nitrite (mg/L)		p- Value
	Đối chứng	Probiotic		Đối chứng	Probiotic	
Tuần 1	0,23±0,03 ^b	0,16±0,04 ^a	0,016	0,10±0,02 ^b	0,07±0,02 ^a	0,028
Tuần 2	0,28±0,05 ^b	0,20±0,05 ^a	0,013	0,33±0,05 ^b	0,16±0,06 ^a	0,001
Tuần 3	0,37±0,06 ^b	0,25±0,04 ^a	0,010	0,58±0,07 ^b	0,35±0,05 ^a	0,012
Tuần 4	0,52±0,05 ^b	0,35±0,08 ^a	0,008	0,95±0,11 ^b	0,42±0,09 ^a	0,007

Ghi chú: Với mỗi chỉ tiêu, giá trị cùng 1 hàng với số mũ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Mật độ vi khuẩn tổng và vi khuẩn *Vibrio* giữa 2 nghiệm thức cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (Bảng 3). Theo đó, mật độ vi khuẩn tổng ở cả 2 nghiệm thức đều tăng dần nhưng ở nghiệm thức probiotic có mật độ khuẩn cao hơn (từ 3,24 đến 8,79 x 10³ CFU/mL) có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (từ 1,51 đến 7,62 x 10³ CFU/mL). Ngược lại ở mật độ *Vibrio*, trong khi ở nghiệm thức đối chứng, khuẩn *Vibrio* tăng dần đến cuối chu kỳ (từ 1,2 đến 6,11 x 10² CFU/mL) thì ở nghiệm thức sử dụng probiotic, mật độ *Vibrio* thấp và ổn định ở mức an toàn cho ấu trùng (từ 0,3 đến 1,32 x 10² CFU/mL), kết quả này khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Việc sử dụng probiotic để kiểm soát và ức chế hoạt động của các vi khuẩn có hại đã được nghiên

cứu nhiều trên các loài khác như cá (Banerjee and Ray, 2017; Munir *et al.*, 2018), tôm (Nimrat *et al.*, 2012), ghẹ (Talpur *et al.*, 2013) và nhuyễn thể (Prado *et al.*, 2010). Quần thể vi sinh hữu ích từ probiotic sẽ tiết ra chất hóa học có tác dụng kiềm khuẩn hay diệt khuẩn để tác động lên quần thể vi sinh vật khác (Fredrickson and Stephanopoulos, 1981), cạnh tranh hóa chất hay năng lượng có sẵn (Pybus *et al.*, 1994) hay sự phát triển quần thể này cạnh tranh khu vực bám của quần thể khác (Verschuere *et al.*, 2000), từ đó làm giảm hay ức chế sự phát triển của quần thể vi sinh vật có hại gây bệnh cho ấu trùng. Bên cạnh đó, sự phát triển của vi khuẩn probiotic cũng ức chế được sự lây lan và phát triển của *Vibrio alginolyticus* từ vỏ Artemia (Villamil *et al.*, 2003).

Bảng 3: Mật độ vi khuẩn tổng và vi khuẩn *Vibrio* trong quá trình ương ấu trùng

	Vi khuẩn tổng (CFU/mL)			Vi khuẩn <i>Vibrio</i> (CFU/mL)		
	Đối chứng	Probiotic	p- Value	Đối chứng	Probiotic	p- Value
Tuần 1	1,51 x 10 ³ ^a	3,24 x 10 ³ ^b	0,019	1,2 x 10 ² ^b	0,3 x 10 ² ^a	0,002
Tuần 2	5,64 x 10 ³ ^a	7,31 x 10 ³ ^b	0,021	2,4 x 10 ² ^b	1,17 x 10 ² ^a	0,015
Tuần 3	6,23 x 10 ³ ^a	8,12 x 10 ³ ^b	0,004	5,21 x 10 ² ^b	1,32 x 10 ² ^a	0,003
Tuần 4	7,62 x 10 ³ ^a	8,79 x 10 ³ ^b	0,025	6,11 x 10 ² ^b	1,22 x 10 ² ^a	0,001

Ghi chú: Với mỗi chỉ tiêu, giá trị cùng 1 hàng với số mũ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.2 Hoạt tính enzyme tiêu hóa

Hoạt tính một số enzyme tiêu hóa của ấu trùng của biển (Protease, Trypsin, Pepsin và Amylase) được thể hiện trong Bảng 4. Kết quả cho thấy, từ giai đoạn Zoea 1 đến Megalope, ở nghiệm thức sử dụng probiotic, hoạt tính các enzyme tiêu hóa cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Tuy nhiên, khi ấu trùng chuyển sang Cua 1, dù hoạt tính enzyme ở nghiệm thức probiotic cao hơn nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Động vật giáp xác thường thiếu các enzyme cần thiết cho sự thủy phân thức ăn. Một số tác giả đã chỉ ra tầm quan trọng của thức ăn tươi sống như thức ăn ngoài đầu tiên của ấu trùng cá và nhuyễn thể, sử dụng các enzyme trong thức ăn để cải thiện tiêu hóa cho đến khi hệ thống tiêu hóa trở nên phát triển hoàn chỉnh (Dabrowski and Glogowski, 1977). Mặt khác, vi khuẩn probiotic có khả năng sản xuất nhiều enzyme tiêu hóa ngoại bào hỗ trợ quá trình trao đổi chất của vật chủ (Banerjee

and Ray, 2017). Có nhiều giả thuyết về tác dụng làm tăng hoạt tính enzyme tiêu hóa của probiotic như: ấu trùng được cho ăn bằng thức ăn tươi sống (artemia, rotifer, tảo...), khi bổ sung probiotic vào bể nuôi, ấu trùng ăn thức ăn tươi sống được cho là bao gồm luôn cả vi khuẩn probiotic (ăn trực tiếp từ nước nuôi hay gián tiếp qua thức ăn tươi sống), quá trình này làm tăng khả năng trao đổi chất bởi vi khuẩn thông qua lượng probiotic tích tụ ở thành ruột, từ đó tăng chức năng tiêu hóa thức ăn (Talpur *et al.*, 2013). Một giả thuyết khác cho rằng probiotic cải thiện sức sống của ấu trùng, giúp hệ thống tiêu hóa của ấu trùng phát triển và hoàn thiện sớm hơn (Gisbert, Piedrahita, and Conklin, 2004). Kết quả từ thí nghiệm trên một số loài giáp xác khác cũng cho thấy tác dụng làm tăng enzyme tiêu hóa trong giai đoạn ấu trùng như tôm sú (Zhou *et al.*, 2009), tôm thẻ chân trắng (Zokaifar *et al.*, 2012). Khi hoàn thành giai đoạn phát triển ấu trùng và chuyển sang Cua 1, tác dụng của probiotic không có ý nghĩa thống kê, điều này có thể giải thích do hệ thống tiêu hóa của

cua biển đã phát triển hoàn chỉnh và các chứng năng tiêu hóa đã hoạt động đầy đủ, kiểm soát hoạt động

các enzyme nội bào nên lượng enzyme tiết ra không khác biệt giữa các nghiệm thức.

Bảng 4: So sánh hoạt tính một số enzyme tiêu hóa của ấu trùng cua biển giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức sử dụng probiotic

Giai đoạn	Protease		p-Value	Pepsin		p-Value	Trypsin		p-Value	Amylase		p-Value
	Đối chứng	Probiotic		Đối chứng	Probiotic		Đối chứng	Probiotic		Đối chứng	Probiotic	
Z1	3,85±0,92 ^a	4,80±0,58 ^b	0,037	1,69±0,09 ^a	1,95±0,06 ^b	0,023	0,92±0,05 ^a	0,98±0,03 ^b	0,035	1,09±0,06 ^a	1,3±0,04 ^b	0,012
Z2	11,95±0,21 ^a	14,90±0,25 ^b	0,022	3,39±0,05 ^a	3,92±0,11 ^b	0,017	2,43±0,57 ^a	2,56±0,27 ^b	0,033	1,86±0,08 ^a	2,17±0,06 ^b	0,009
Z3	12,55±0,35 ^a	15,70±0,19 ^b	0,014	3,67±0,04 ^a	4,25±0,15 ^b	0,016	1,71±0,42 ^a	1,83±0,33 ^b	0,027	0,64±0,08 ^a	0,75±0,10 ^b	0,020
Z4	12,85±0,92 ^a	16,01±0,72 ^b	0,008	4,45±0,11 ^a	5,12±0,22 ^b	0,023	1,59±0,42 ^a	1,70±0,40 ^b	0,033	8,89±0,20 ^a	10,4±0,14 ^b	0,015
Z5	15,00±0,71 ^a	18,75±0,91 ^b	0,016	5,46±0,20 ^a	6,30±0,27 ^b	0,026	9,90±0,49 ^a	10,59±0,38 ^b	0,043	9,36±0,08 ^a	11,10±0,11 ^b	0,021
Megalope	15,95±0,35 ^a	19,9±0,47 ^b	0,011	5,18±0,08 ^a	6,10±0,13 ^b	0,035	2,45±0,35 ^a	2,68±0,44 ^b	0,038	7,50±0,17 ^a	8,80±0,09 ^b	0,027
Cua-1	19,10±0,75 ^a	19,60±0,44 ^a	0,528	8,32±0,26 ^a	8,55±0,19 ^a	0,298	3,94±0,06 ^a	4,10±0,15 ^a	0,196	4,21±0,15 ^a	4,32±0,13 ^a	0,554

Ghi chú: Với cùng 1 loại enzyme, trong cùng 1 hàng các giá trị mang số mũ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.3 Tỷ lệ sống và biến thái của ấu trùng

Tỷ lệ biến thái và tỷ lệ sống của ấu trùng cua biển được thể hiện ở Bảng 5 và Hình 1. Kết quả cho thấy, ở nghiệm thức đối chứng có tỷ lệ biến thái ấu trùng thấp (từ 35,2 đến 83,2), trong khi nghiệm thức sử dụng probiotic có kết quả từ 40,3 đến 88,6, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$). Tỷ

lệ sống của ấu trùng ở giai đoạn Z4 lần lượt là 60,8% ở đối chứng và 73,2% ở nghiệm thức probiotic. Khi chuyển sang megalope, tỷ lệ này giảm xuống lần lượt là 20,6% và 46,4%. Đến giai đoạn Cua 1, tỷ lệ sống cao nhất được ghi nhận ở nghiệm thức probiotic 14,5% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (6,3%).

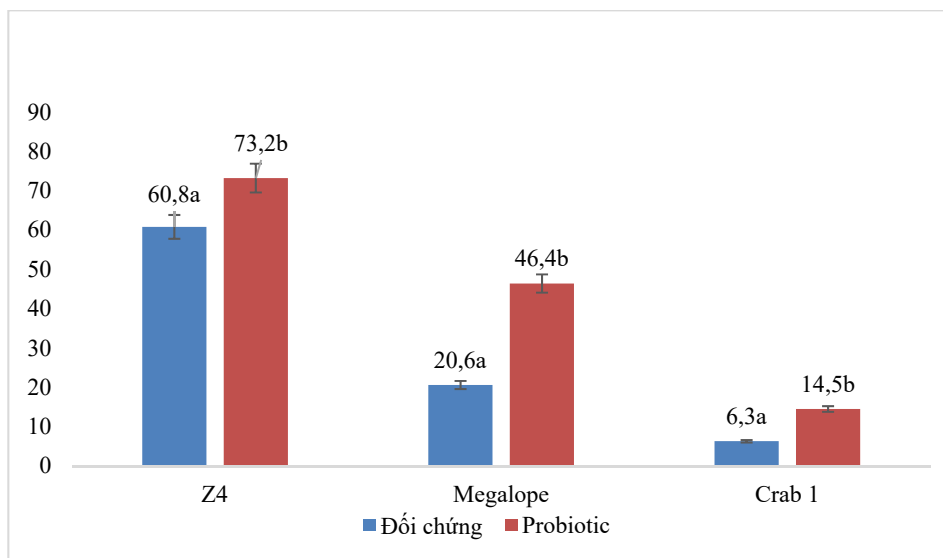
Bảng 5: Tỷ lệ biến thái của ấu trùng (LSI):

Giai đoạn ấu trùng	Tỷ lệ biến thái ấu trùng (LSI)			
	Z2	Z3	Z4	Z5
Đối chứng	35,2 ± 2,3 ^a	72,2 ± 3,6 ^a	83,2 ± 3,3 ^a	60,7 ± 3,1 ^a
Probiotic	40,3 ± 1,5 ^b	79,8 ± 2,1 ^b	88,6 ± 2,6 ^b	70,1 ± 2,8 ^b
p - Value	0,022	0,037	0,032	0,021

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các giá trị có số mũ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả từ các nghiên cứu trước đây đã chứng minh việc bổ sung probiotic khi ương ấu trùng động vật thủy sản sẽ giúp cải thiện quá trình tiêu hóa bằng cách tăng hoạt tính của enzyme, từ đó tăng khả năng hấp thụ dinh dưỡng của ấu trùng (Prado *et al.*, 2010). Bên cạnh đó mật độ vi khuẩn *Vibrio* cũng sẽ được làm giảm, ức chế sự phát triển của vi khuẩn có hại và giảm hàm lượng TAN, nitrite trong môi trường nước (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014), tăng khả năng

miễn dịch (Banerjee and Ray, 2017), điều này có thể giúp giải thích sự khác biệt về tỷ lệ biến thái và tỷ lệ sống của ấu trùng cua biển ở các nghiệm thức. Zhou *et al.* (2009) và Zokaeifar *et al.* (2012) cũng báo cáo rằng *Bacillus* probiotic có khả năng làm tăng sức sinh trưởng, tỷ lệ sống, hoạt tính enzyme tiêu hóa và biểu hiện của các gene miễn dịch trên ấu trùng tôm thẻ chân trắng. Hiệu quả tương tự cũng được ghi nhận trên ấu trùng tôm sú (Nimrat *et al.*, 2013).



Hình 1: Tỷ lệ sống của ấu trùng cua biển (%)

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Việc bổ sung probiotic *Bacillus subtilis* (10^6 CFU/mL) khi ương ấu trùng cua biển cho hiệu quả cao, giúp cải thiện chất lượng nước, giảm hàm lượng TAN, nitrite và mật độ *Vibrio* trong nước.

Probiotic *Bacillus subtilis* (10^6 CFU/mL) giúp làm tăng các hoạt tính enzyme protease, trypsin, pepsin và amylase. Tỷ lệ biến thái (40,3 đến 88,6) và tỷ lệ sống của ấu trùng cua biển (14,5%) khi bổ sung *Bacillus subtilis* (10^6 CFU/mL) cao hơn so với khi không sử dụng probiotic.

4.2 Đề xuất

Từ kết quả của nghiên cứu này, cần tiến hành các thí nghiệm đánh giá sự ảnh hưởng của probiotic *Bacillus subtilis* lên các gene tăng trưởng và miễn dịch của cua biển làm cơ sở khoa học cho việc hoàn thiện quy trình ứng dụng probiotic trong sản xuất giống cua biển.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Banerjee, G., and Ray, A. K. (2017). The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research in Veterinary Science*, 115, 66–77.

Barak, Y., Cytryn, E., Gelfand, I., Krom, M., and Van Rijn, J. (2003). Phosphorus removal in a marine prototype, recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, 220(1–4), 313–326.

Browdy, C. L. (1998). Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: Improving the outlook for superior captive stocks. *Aquaculture*, 164(1–4), 3–21.

Dabrowski, K., and Glogowski, J. (1977). Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in

digestion processes in fish. *Hydrobiologia*, 54(2), 129–134.

Fredrickson, A. G., and Stephanopoulos, G. (1981). Microbial competition. *Science* (New York, N.Y.), 213(4511), 972–9.

Gisbert, E., Piedrahita, R. H., and Conklin, D. E. (2004). Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232(1–4), 455–470.

Gomez-Gil, B., Roque, A., and Turnbull, J. F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191(1–3), 259–270.

Holme, M.-H. (2008). Towards development of a formulated diet for mud crab (*Scylla serrata*) larvae, with emphasis on lipid nutrition. James Cook University. James Cook University.

Janarthanam, K., Rosalind George, M., Riji John, K., and Prince Jeyaseelan, M. J. (2012). In vitro and in vivo biocontrol of *Vibrio harveyi* using indigenous bacterium, *Bacillus* spp. *Indian Journal of Marine Sciences*, 41(1), 947–953.

Li, S., Zhang, Z., Li, C., Zhou, L., Liu, W., Li, Y., Wen, X. (2012). Molecular cloning and expression profiles of nitric oxide synthase (NOS) in mud crab *Scylla paramamosain*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(4), 503–512.

Liessman, L. (2005). Investigation into the mortalities of larval mud crabs, *Scylla serrata* and methods of control. James Cook University, Townsville, Australia.

Lindner, B. (2005). Impacts of mud crab hatchery technology in Vietnam ACIAR projects FIS / 1992 / 017 and FIS / 1999 / 076. ACIAR projects FIS/1992/017 and FIS/1999/076.

Lu, L., Tan, H., Luo, G., and Liang, W. (2012). The effects of *Bacillus subtilis* on nitrogen recycling

- from aquaculture solid waste using heterotrophic nitrogen assimilation in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 124, 180–185.
- Mandiki, S., Milla, S., Wang, N., Blanchard, G., Djonkack, T., Tanascaux, S., and Kestemont, P. (2011). Effects of probiotic bacteria on growth parameters and immune defence in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. larvae under intensive culture conditions. *Aquaculture Research*, 42(5), 693–703.
- andandMezhoud, H., Chantziaras, I., Iguer-Ouada, M., Moula, N., Garmyn, A., Martel, A., Boyen, F. (2016). Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Avian Pathology*, 45(4), 493–500.
- Munir, M. B., Hashim, R., Nor, S. A. M., and Marsh, T. L. (2018). Effect of dietary prebiotics and probiotics on snakehead (*Channa striata*) health: Haematology and disease resistance parameters against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 75(February), 99–108.
- Muthukrishnan, S., Sabaratnam, V., Tan, G. Y. A., and Chong, V. C. (2015). Identification of indigenous bacteria isolated from shrimp aquaculture wastewater with bioremediation application: Total ammoniacal nitrogen (TAN) and nitrite removal. *Sains Malaysiana*, 44(8), 1103–1110.
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H., and Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 1–11.
- Thao, N. T. T., Dao, T. M. D., and Vo, M. T. (2012). Effects of probiotic supplementations on growth and survival rate of juvenile clam (*Meretrix lyrata*). *Can Tho University Journal of Science*, 21b, 97–107.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., and Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159(3–4), 443–450.
- Nimrat, S., Tanutpongpalin, P., Sritunyalucksana, K., Boonthai, T., and Vuthiphandchai, V. (2013). Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. *Aquaculture International*, 21(3), 655–666.
- Nurdiani, R., and Zeng, C. (2007). Effects of temperature and salinity on the survival and development of mud crab, *Scylla serrata* (Forssk), larvae. *Aquaculture Research*, 38(14), 1529–1538.
- Nyqvist, D. (2011). Impact of crab-seed collection for aquaculture on juvenile mud-crab (*Scylla serrata*) populations at Mafia Island, Tanzania. University of Gothenburg. University of Gothenburg.
- Parra, G., and Yu, M. (2002). Tolerance response to water pH in larvae of two marine fish species, gilthead seabream, *Sparus aurata* (L.) and Senegal sole, *Solea senegalensis* (Kaup), during development. *Aquaculture*, 747–752.
- Pavasovic, M. (2004). Digestive profile and capacity of the mud crab (*Scylla serrata*). The Queensland University of Technology.
- Prado, S., Romalde, J. L., and Barja, J. L. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology*, 145(3–4), 187–197.
- Pybus, V., Loutit, M. W., Lamont, I. L., and Tagg, J. R. (1994). Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4355. *Journal of Fish Diseases*, 17(4), 311–324.
- Saebom S. (2016). Evaluation of the Efficacy of Candidate Probiotics for Disease Prevention in Shellfish Hatcheries. University of Rhode Island.
- Sumon, M. S., Ahmmed, F., Khushi, S. S., Ahmmed, M. K., Rouf, M. A., Chisty, M. A. H., and Sarower, M. G. (2018). Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* fed with probiotic *Clostridium butyricum* incorporated diets. *Journal of King Saud University - Science*, 30(1), 21–28.
- Suzer, C., Kamaci, H. O., Coban, D., Saka, S., Firat, K., Ozkara, B., and Ozkara, A. (2007). Digestive enzyme activity of the red porgy (*Pagrus pagrus*, L.) during larval development under culture conditions. *Aquaculture Research*, 38(16), 1778–1785.
- Talib, A., Onn, K.K., Chowdury, M.A., Din, W.M.W. and Yahya, K. (2017). The beneficial effects of multispecies *Bacillus* as probiotics in enhancing culture performance for mud crab *Scylla paramamosain* larval culture. *Aquac. Int.* 25, 849–866.
- Talpur, A. D., Ikhwanuddin, M., Abdullah, M. D. D., and Ambok Bolong, A. M. (2013). Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): Effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. *Aquaculture*, 416–417, 173–178.
- Talpur, A. D., Memon, A. J., Khan, M. I., Ikhwanuddin, M., Danish Daniel, M. M., and Abol-Munafi, A. B. (2011). A novel of gut pathogenic bacteria of blue swimming crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) and pathogenicity of *Vibrio harveyi* a transmission agent in larval culture under hatchery conditions.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture.

- Microbiology and molecular biology reviews, 64(4), 655–671.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., and Novoa, B. (2003). Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219(1–4), 43–56.
- Wang, Y. B., Li, J. R., and Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1–4), 1–4.
- Wu, Q., Wang, S., You, C., and Li, Y. (2016). Immune Response of Mud Crab, *Scylla Paramamosain*, to Bacterial Lipopolysaccharide. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(6), 843–853.
- Yarahmadi, P., Ghafari Farsani, H., Khazaei, A., Khodadadi, M., Rashidiyan, G., and Jalali, M. A. (2016). Protective effects of the prebiotic on the immunological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 589–597.
- Zhang, Y. Bin, Li, Y., and Sun, X. L. (2011). Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China. *Marine Pollution Bulletin*, 62(11), 2299–2307.
- Zhou, X., Wang, Y., and Li, W. (2009). Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 287(3–4), 349–353.
- Zokacifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., and Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(4), 683–689.