

DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.153

SỬ DỤNG RIFAMYCIN NHƯ CHẤT KIỂM HÃM VI KHUẨN VÀ ỨNG DỤNG KỸ THUẬT ĐÁNH DẤU ĐỒNG VỊ BỀN N^{15} TRONG NGHIÊN CỨU HẤP THỤ DINH DƯỠNG CỦA *Artemia* TRONG ĐIỀU KIỆN GNOTOBIOTIC

Huỳnh Thanh Tới và Nguyễn Thị Hồng Vân

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 28/04/2017

Ngày nhận bài sửa: 28/06/2017

Ngày duyệt đăng: 30/11/2017

Title:

Use of rifamycin as bacteriostatic and ^{15}N tracing in study on the *Artemia* nutrient assimilation in gnotobiotic conditions

Từ khóa:

Artemia, đồng vị bền N^{15} , gnotobiotic, rifamycin, vi khuẩn

Keywords:

Artemia, bacteria, gnotobiotic, isotope ^{15}N , rifamycin

ABSTRACT

Study was carried to examine the ingestion and assimilation of *Artemia* on bacteria in gnotobiotic conditions (known strain of bacteria). *Artemia* were offered with different mixed diets between baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* (mnn9) and ^{15}N bacteria HT3 (*Tamlana* sp. ZJU HZ22) and the proportion of bacteria gradually increased 25% in feeding regime (based on dry weight) for each treatment, rifamycin was used as bacteriostatic at 10 ppm. Results showed that the addition of rifamycin into *Artemia* culture water did not affect on survival and growth of *Artemia* after 6 days of culture. The ^{15}N concentration in *Artemia* tissue increased with increasing ^{15}N bacteria in the test diets. The result of this study illustrated that *Artemia* utilized and assimilated bacteria and utilized more bacteria in the poor food condition.

TÓM TẮT

Thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá khả năng lọc và hấp thụ dinh dưỡng của *Artemia* từ vi khuẩn trong điều kiện gnotobiotic (là điều kiện đã biết được loài vi khuẩn trong môi trường nuôi). *Artemia* được cho ăn với thức ăn pha trộn theo phần trăm giữa nấm men *Saccharomyces cerevisiae* dòng mnn9 và vi khuẩn HT3 (*Tamlana* sp. ZJU HZ22) đã được đánh dấu chất đồng vị bền N^{15} , phần trăm của vi khuẩn trong khẩu phần ăn được tăng dần 25% theo nghiệm thức, và rifamycin được sử dụng với nồng độ 10 ppm để kiểm hãm sự phân chia của vi khuẩn (tránh làm giảm đi hàm lượng N^{15} trong vi khuẩn). Kết quả cho thấy rifamycin không ảnh hưởng đến tỉ lệ sống và tăng trưởng của *Artemia* sau 6 ngày nuôi. Hàm lượng N^{15} tích tụ trong mô của *Artemia* tỉ lệ thuận với sự tăng dần của vi khuẩn trong khẩu phần ăn. Kết quả này đã làm sáng tỏ *Artemia* có khả năng tiêu hóa và hấp thụ dinh dưỡng từ vi khuẩn và *Artemia* tiêu thụ nhiều vi khuẩn khi điều kiện nuôi thiếu thức ăn.

Trích dẫn: Huỳnh Thanh Tới và Nguyễn Thị Hồng Vân, 2017. Sử dụng rifamycin như chất kiểm hãm vi khuẩn và ứng dụng kỹ thuật đánh dấu đồng vị bền N^{15} trong nghiên cứu hấp thụ dinh dưỡng của *Artemia* trong điều kiện gnotobiotic. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53b: 24-31.

1 GIỚI THIỆU

Ấu trùng *Artemia* được xem là loại thức ăn tươi sống tốt cho sự phát triển của các loài tôm cá giai đoạn ấu trùng bởi vì nó đáp ứng được nhu cầu dinh

dưỡng và tiện lợi khi sử dụng (Sorgeloos *et al.*, 2001). Thêm vào đó, *Artemia* trưởng thành có giá trị dinh dưỡng cao như hàm lượng protein gần 50% và lipid 10% cùng với giàu các acid béo thiết yếu, vì thế nó đã được sử dụng để thay thế bột cá trong

thành phần thức ăn cho các loài thủy sản (Anh *et al.*, 2009).

Artemia được nuôi bằng các loại thức ăn như tảo (Fábregas *et al.*, 1996; Thinh *et al.*, 1999) nhưng giá thành khá cao khi nuôi chúng bằng tảo trong bể (Lavens and Sorgeloos, 1991). Nhờ vào khả năng ăn lọc của chúng, nên *Artemia* cũng được nuôi bằng các loại thức ăn khác như cám gạo, bột đậu nành (Anh *et al.*, 2009), phân gà (Baert *et al.*, 1997), nấm men (Coutteau *et al.*, 1990). Trong mô hình nuôi truyền thống tại Vĩnh Châu, Sóc Trăng, *Artemia* được cho ăn bằng tảo (gây màu từ ao bón phân bằng phân gà, phân vô cơ), phân gà, và cám gạo được sử dụng như là thức ăn bổ sung (Baert *et al.*, 1997; Nguyễn Văn Hòa và *ctv.*, 2007), nhưng vai trò vi khuẩn trong khẩu phần thức ăn của *Artemia* thì chưa được quan tâm nhiều. Những năm gần đây, việc ứng dụng công nghệ biofloc trong nuôi *Artemia* (Ronald *et al.*, 2013; Sui *et al.*, 2013) đã cải thiện được năng suất trứng bào xác *Artemia*, nhưng các số liệu tham khảo của thí nghiệm trên vẫn chưa chứng minh được *Artemia* có khả năng sử dụng và tiêu hóa được vi khuẩn trong môi trường nuôi. Hơn nữa, rất khó để xác định được sự đóng góp về mặt dinh dưỡng của vi khuẩn trong chuỗi thức ăn của *Artemia* trong điều kiện nuôi ao vì *Artemia* ăn lọc rất nhiều loại thức ăn khác nhau hiện diện trong môi trường nước nuôi nhưng với việc phân lập vi khuẩn từ ao nuôi và đưa về phòng thí nghiệm với các điều kiện được kiểm soát thì có thể thực hiện được.

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, vi khuẩn đã được chứng minh là nguồn thức ăn cho *Artemia* trong điều kiện thức ăn đơn thuần (Yasuda and Taga, 1980; Intriago and Jones, 1993; Gorospe *et al.*, 1996; Toi *et al.*, 2014). Tuy nhiên, khi kết hợp nhiều loại thức ăn với nhau thì rất khó xác định được *Artemia* đã ăn loại thức ăn nào làm nguồn dinh dưỡng cho quá trình phát triển của chúng. Với kỹ thuật đánh dấu nitơ đồng vị bền N¹⁵ trên protein của thành phần thức ăn, một số nghiên cứu trước đã xác định được quá trình tiêu hóa và hấp thụ thức ăn đơn trong hỗn hợp thức ăn đối với tôm sú *Penaeus monodon* (Preston *et al.*, 1996). Bên cạnh đó, tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* (Burford *et al.*, 2004) và cá rô phi (Avnimelech *et al.*, 2009) được nuôi trong hệ thống biofloc cũng chứng minh được cá và tôm đã tiêu hóa và hấp thụ biofloc như loại thức ăn bổ sung. Do vậy, thí nghiệm hiện tại được tiến hành sử dụng chất đánh dấu đồng vị bền N¹⁵ để theo dõi đường đi của dinh dưỡng từ vi khuẩn trong hỗn hợp thức ăn sang *Artemia* làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo ở điều kiện thực địa.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện gnotobiotic, và sử dụng vi khuẩn đã được đánh dấu đồng vị bền làm thức ăn cho *Artemia*. Để tránh sự phân chia của vi khuẩn có thể làm giảm hàm lượng N¹⁵ trong tế bào vi khuẩn, rifamycin (rifa) đã sử dụng như một chất kim hãm sự phát triển của vi khuẩn trong thí nghiệm.

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của rifamycin lên tỉ lệ sống và phát triển của *Artemia*

Thí nghiệm được thực hiện với 5 nghiệm thức trong điều kiện gnotobiotic, mỗi nghiệm thức có 4 lần lặp lại. Hai mươi *Artemia* nauplii vô trùng (instar I) được đếm trong tủ cấy vô trùng (Laminar flow) và chuyển vào nuôi trong ống thủy tinh 40 mL vô trùng có nút vặn kín, mỗi ống thủy tinh chứa 30 mL nước biển 30 ppt được lọc 0,22 μm và đã tiệt trùng. Năm dòng vi khuẩn tương đương với 5 nghiệm thức là LVS2 (*Bacillus* sp.), LVS3 (*Aeromonas hydrophila*), LVS8 (*Vibrio* sp.), HT3 (*Tamlana* sp. ZJU HZ22), và HT6 (*Bacillus subtilis* 168) và các dòng này đã chứng minh là thức ăn tốt cho *Artemia* (Toi *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2005), đã được chọn cho thí nghiệm này. Vi khuẩn được đưa vào theo từng nghiệm thức với liều lượng là 5×10⁶ tế bào (tb)/mL trước khi thí nghiệm bắt đầu. Sau đó nấm men bánh mì *Sacchomyces cerevisiae* dòng mnn9 được sử dụng làm thức ăn chính cho *Artemia* trong thí nghiệm này trong 5 ngày. *Artemia* được cho ăn dựa theo bảng thức ăn tiêu chuẩn của Coutteau *et al.* (1990).

Bảng 1: Lượng nấm men cho 20 *Artemia*/ngày

Ngày nuôi	Nấm men (tb/20 nauplii)
1	99 × 10 ⁶
2	118 × 10 ⁶
3	118 × 10 ⁶
4	224 × 10 ⁶
5	336 × 10 ⁶

Rifamycin (C₃₇H₄₇NO₁₂) là chất kháng sinh chiết suất từ nấm, nhưng khi sử dụng với liều lượng thấp thì có chức năng kiềm chế sự phát triển của vi khuẩn. Theo thí nghiệm thăm dò trước đây, vi khuẩn chỉ ngưng phân chia tế bào khi ở trong môi trường rifamycin 10 ppm, nhưng sẽ phân chia tế bào phát triển trở lại khi loại hết rifamycin trong môi trường sống của chúng. Do đó, hàm lượng rifamycin 10 ppm được đưa vào mỗi ống nuôi *Artemia* trước khi thí nghiệm bắt đầu.

Thí nghiệm 2: Đánh giá khả năng ứng dụng chất đánh dấu đồng vị bền N¹⁵ trong việc theo dõi đường dinh dưỡng từ vi khuẩn sang *Artemia*

Artemia (giai đoạn Instar I) vô trùng được bố trí nuôi trong bình Duran 1 L trong điều kiện gnotobiotic, với mật độ nuôi là 20 nauplii/mL. Mỗi bình chứa 1 L nước biển (30 ppt) được lọc qua giấy lọc 0,22 µm và đã được khử trùng. Bình Duran được thiết kế với phần chính giữa nắp được lắp đặt 2 ống với đầu vào và đầu ra của hệ thống sục khí, khí được lọc trước khi đi vào và đi ra hệ thống nuôi *Artemia* được lọc qua giấy lọc 0,22 µm để tránh bị nhiễm tạp. Sau khi bố trí *Artemia*, rifamycin được đưa vào nước nuôi *Artemia* với liều lượng 10 ppm.

Men bánh mì *Sacchomyces cerevisiae* dòng mnn9 và chất đánh dấu đồng vị bền N¹⁵ trên vi khuẩn HT3 (HT3-N¹⁵) được phối trộn làm thức ăn cho *Artemia* với 5 nghiệm thức (NT) trong đó nghiệm thức không chứa HT3-N¹⁵ là nghiệm thức đối chứng, 4 nghiệm thức còn lại HT3-N¹⁵ được đưa vào thức ăn với các mức tăng dần là 25, 50, 75 và 100%, và tỉ lệ mnn9 giảm theo tỉ lệ tương ứng của mức tăng HT3-N¹⁵ trong hỗn hợp thức ăn với tỉ lệ tổng là 100%.

NT1: 100% mnn9

NT2: 75% mnn9+25% HT3-N¹⁵

NT3: 50% mnn9+50% HT3-N¹⁵

NT4: 25% mnn9+75% HT3-N¹⁵

NT5: 100% HT3-N¹⁵

Hệ thống thí nghiệm được đặt trong phòng có điều khiển nhiệt độ (28°C) và các bình nuôi được lắp đặt kết nối với hệ thống sục khí. *Artemia* được cho ăn 1 lần với lượng cho ăn là 9,1 mg (tính theo khối lượng khô) thức ăn cho mỗi bình nuôi (Toi *et al.*, 2014) và theo dõi trong 24 h.

2.2 Chuẩn bị *Artemia* nauplii vô trùng

Đề thu được ấu trùng *Artemia* (nauplii) vô trùng, trứng *Artemia* dòng *Artemia franciscana* Kellogg 1906 (loại EG®, INVE Aquaculture, Belgium) được tách vô trùng theo phương pháp của Sorgeloos *et al.* (1977) và Marques *et al.* (2006) như sau: trứng khô được ngâm trong nước ngọt khoảng 1 h và sau đó được chuyển vào tủ cấy vô trùng để tiến hành bóc vỏ trứng bằng natri hypoclorit (NaOCl) với liều 200 ppm. Sau khi vỏ được tách hoàn toàn (khoảng 1 phút 30 giây). Trứng bóc vỏ được thu bằng sần vô trùng và được rửa nhiều lần với nước biển đã khử trùng để loại bỏ tồn dư của clo. Sau đó, trứng được chuyển qua áp trong bình 1 L vô trùng chứa 1 L nước biển (30 ppt) đã khử trùng (Marques *et al.*, 2006) ở nhiệt độ 28°C trong vòng 24 -30 h theo điều kiện nở chuẩn (Sorgeloos *et al.*, 1986).

2.3 Chuẩn bị nước biển vô trùng

Nước biển (30 ppt) được lọc qua giấy lọc 0,22 µm để loại bỏ vi khuẩn, nước lọc được đưa vào

bình Duran 2 L để khử trùng bằng nồi hấp tiết trùng (autoclave) với nhiệt độ 121°C trong 20 phút, sau khi autoclave xong, nắp vận cần phải đóng kín để tránh nhiễm khuẩn từ môi trường ngoài.

2.4 Chuẩn bị thức ăn

Nuôi cấy, đánh dấu N¹⁵ và thu hoạch vi khuẩn

Mỗi loài vi khuẩn được cấy trên đĩa thạch Marine Agar (MA; BD Difco™). Khuẩn lạc sẽ xuất hiện sau hai ngày ủ trong tủ ẩm ở 28°C. Khuẩn lạc (đơn) được thu hoạch bằng que cấy vô trùng và chuyển sang nuôi trong bình tam giác 1 L vô trùng chứa 500 mL chất dinh dưỡng cho vi khuẩn dị dưỡng nước lợ bằng môi trường chuyên dụng lỏng được cải tiến (Modified-Marine broth; M-MB). Dung dịch M-MB gồm 0,1 g/L NaNO₃, 2,0 g/L chiết xuất từ men bánh mì (yeast extract), 0,1 g/L Fe(III) citrate, 19,45 g/L NaCl, 5,9 g/L MgCl₂ (anhydrous), 3,24 g/L Na₂SO₄, 1,8 g/L CaCl₂, 0,55 g KCl, 0,16 g/L Na₂CO₃, 0,08 g/L KBr, 0,034 g/L SrCl₂, 0,022 g/L H₃BO₃, 0,004 g/L Na-silicate, 0,0024 g/L NaF, 0,0016 g/L NH₄NO₃, 0,008 g/L Na₂PO₄, với pH cuối cùng là 7,6. Đối với vi khuẩn đánh dấu N¹⁵, môi trường M-MB cũng được chuẩn bị giống như nuôi vi khuẩn nhưng 0,01 g/L NaNO₃ được thay thế bằng N¹⁵ NaNO₃ (Sigma). Sau khi được cấy xong, bình nuôi được chuyển vào tủ ủ và lắc (28°C; 150 rpm) trong 24 h. Kỹ thuật đánh dấu làm tăng N¹⁵ trong tế bào vi khuẩn HT3 từ 0,0389% lên 10,06%.

Mật số (tế bào/mL) của vi khuẩn được xác định bằng cách đo độ đục của mẫu bằng máy quang phổ ở bước sóng 550 nm, giả định rằng mật độ quang học là 1 thì tương đương với 1,2×10⁹ tế bào (tb)/mL theo tiêu chuẩn McFarland (BioMerieux, Marcy L'Etoile, France).

Nuôi và thu hoạch men bánh mì

Men bánh mì dòng mnn9 có nguồn gốc từ European *Saccharomyces cerevisiae* của EUROSCARF, Đại học Frankfurt, Germany, đã được sử dụng trong nghiên cứu này.

Trước khi nuôi để thu số lượng lớn, men được cấy trên môi trường thạch dành cho nuôi cấy nấm men (thạch Yeast Extract Peptone Dextrose; YEPD) chứa 10 g/L chất chiết xuất từ nấm men (Sigma), 10 g/L peptone (Sigma), 20 g/L dextrose (Sigma), and 20 g/L thạch. Môi trường dinh dưỡng được pha trong nước biển đã lọc qua giấy lọc (0,22 µm) để loại bỏ vi khuẩn. Sau đó hỗn hợp dung dịch được khử trùng bằng autoclave với nhiệt độ 121°C trong vòng 20 phút. Sau khi cấy xong, đĩa thạch nuôi nấm men được nuôi trong tủ ủ 3 ngày ở nhiệt độ 28°C.

Khi khuẩn lạc xuất hiện, đơn khuẩn lạc được thu hoạch bằng que cấy vô trùng và chuyển vào bình tam giác 500 mL vô trùng. Mỗi bình tam giác chứa 300 mL dung dịch yeast nitrogen base (YNB, không chứa ammonium sulfate và amino acids) được lọc qua giấy lọc 0,22 μm và thêm vào đó 5,0 g/L ammonium sulfate, 5,0 g/L D-glucose, 0,02 g/L L-histidine, 0,04 g/L L-methionine, và 0,04 g/L LD-tryptophan trong nước biển tiệt trùng.

Sau khi cấy, bình nuôi nấm men được đậy kỹ bằng nút bông gòn vô trùng và được đặt trên máy ủ lắc (28°C; 120 rpm). Nấm men được thu hoạch sau 24 giờ nuôi và đưa qua ống Falcon 50 mL vô trùng, và tế bào nấm men được thu hoạch sau khi ly tâm ($\pm 2,000 \times$ lực ly tâm g; 5 phút). Sau đó, tế bào nấm được rửa bằng nước biển vô trùng 2 lần để loại bỏ hết môi trường dinh dưỡng (Marques *et al.*, 2006; Soltanian *et al.*, 2007) và tế bào nấm được lắc đều trong nước biển vô trùng để sử dụng cho thí nghiệm. Mật độ tế bào nấm men được xác định bằng buồng đếm Burkler dưới kính hiển vi (10X), số lượng tế bào được đếm trong 20 ô theo 2 đường chéo của buồng đếm và được đếm 2 lần, và được tính theo công thức:

$$\text{Tế bào (tb) nấm (tb/mL)} = (A1+A2)/(2 \times 20) \times \text{hệ số pha loãng} \times 1000 \times 250$$

Trong đó: A1 và A2 lần lượt là tổng số tb đếm đường trong 20 ô đầu tiên và 20 ô thứ hai.

Xác định khối lượng khô của vi khuẩn và nấm men

Khối lượng khô của vi khuẩn và nấm men được xác định theo phương pháp mô tả của Soltanian *et al.* (2007) như sau: 50 mL vi khuẩn và nấm men được lọc qua giấy lọc (xác định trọng lượng giấy lọc trước) 0,45 μm giấy lọc Whatman sử dụng bình phễu Buchner được nối với máy hút; sau đó được rửa qua dung dịch ammonium formate (0,5 M) để loại bỏ muối, tiếp đến giấy lọc được thu hoạch, đặt lên giấy nhôm và được làm khô trong tủ sấy ở nhiệt độ $104 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 4 h. Sau đó, mẫu được đưa ra khỏi tủ sấy và đặt trong bình hút ẩm để nhiệt độ hạ xuống, mẫu được cân bằng cân phân tích với 4 số lẻ.

2.5 Xác định mức độ vô trùng của thí nghiệm

Nước nuôi *Artemia* ở nghiệm thức không cho ăn bằng vi khuẩn, nước ấp *Artemia* và thức ăn *Artemia* (nấm men) được nuôi cấy trên đĩa thạch MA (n=2). Sau khi cấy xong, đĩa thạch được ủ trong tủ ở nhiệt độ 28°C trong 5 ngày, sau đó các đĩa thạch được kiểm tra, nếu một trong các mẫu bị nhiễm thì bị loại bỏ và thí nghiệm được lặp lại cho đến khi đạt được mức độ vô trùng.

2.6 Thu thập và xử lý số liệu

Chiều dài và tỉ lệ sống

Ở thí nghiệm 1, sau khi kết thúc thí nghiệm *Artemia* sẽ được thu và đếm số lượng còn lại để tính toán tỉ lệ sống. Sau đó, *Artemia* được cố định bằng Lugol để đo chiều dài thân. Chiều dài thân được vẽ dưới kính hiển vi có kính vẽ, và số liệu này được chuyển đổi thành giá trị chiều dài thực bằng phần mềm *Artemia* 1.0 (courtesy of Marnix Van Damme).

Hàm lượng N^{15} trong mô của *Artemia*

Đối với thí nghiệm 2, sau khi kết thúc thí nghiệm, *Artemia* được thu bằng lưới và chuyển qua cốc thủy tinh 500 mL chứa 300 mL nước biển vô trùng, sau đó *Artemia* được cho ăn bằng cellulose không chứa nitrogen với kích cỡ hạt $< 20 \mu\text{m}$; Sigma được xem là tối ưu cho hoạt động ăn lọc của *Artemia* (Makridis và Vadstein, 1999), và liều lượng cellulose gấp 3 lần lượng thức ăn tiêu chuẩn. Mục đích của việc nhồi sinh học này nhằm đẩy bỏ tất cả thức ăn (nấm men, và vi khuẩn đánh dấu đồng vị bền) chưa được tiêu hóa ra khỏi đường ruột *Artemia*. Trong quá trình nhồi sinh học, *Artemia* được lấy mẫu và kiểm tra thường xuyên dưới kính hiển vi, khi đường ruột *Artemia* đầy với hạt cellulose thì tiến hành thu hoạch *Artemia*, sau đó *Artemia* rửa sạch để loại bỏ thức ăn và cellulose dư thừa, *Artemia* được nhúng vào dung dịch benzocaine (Sigma, 0.1%) trong 10 giây, và chuyển sang nhúng vào dung dịch benzalkonium chloride (Sigma, 0.1%) trong 10 giây để diệt hết các vi khuẩn bám trên cơ thể *Artemia* (Chládková *et al.*, 2004). Sau đó, *Artemia* được rửa sạch bằng nước biển vô trùng và 400 con *Artemia* được đưa vào cốc giấy nhôm (xác định trọng lượng trước) và được sấy khô ở nhiệt độ 70°C trong 24 h. Khối lượng mẫu được xác định trước khi phân tích làm hàm lượng N^{15} tích tụ trong *Artemia*.

Hàm lượng N^{15} trong *Artemia* được đo bằng phương pháp phân tích khoáng chất (ANCA-SL, PDZ Europa, UK) cùng với tỉ lệ khối lượng đồng vị quang phổ (IRMS) (20-20, SerCon, UK) tại Bộ môn Ứng dụng Vật lý Hóa phân tích, Trường Đại học Ghent, Vương Quốc Bỉ.

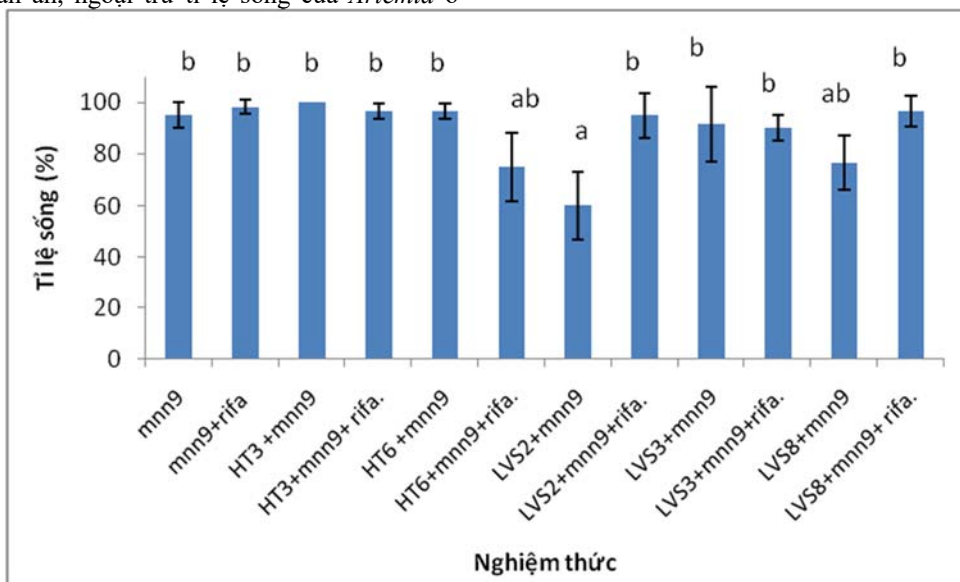
2.7 Xử lý thống kê

Số liệu được tính trung bình và độ lệch chuẩn bằng phần mềm Excel và chương trình thống kê Statistica 10.0 với one-way ANOVA để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở mức $p < 0,05$ với phép thử Tukey.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tỉ lệ sống của *Artemia* ở ngày nuôi thứ 6 được trình bày trong Hình 1. Kết quả cho thấy tỉ lệ sống *Artemia* ở các nghiệm thức khá cao (>90%), ngoại trừ *Artemia* ở nghiệm thức LVS2+mnn9 có tỉ lệ sống thấp nhất (60%), và kế đến là *Artemia* ở HT6+mnn9+rifa. (75%) và LVS8+mnn9 (76%). Khi so sánh nghiệm thức có và không có bổ sung rifamycin trong cùng nguồn thức ăn cho thấy tỉ lệ sống không giảm do bổ sung rifamycin ở tất cả khẩu phần ăn, ngoại trừ tỉ lệ sống của *Artemia* ở

nghiệm thức B6+mnn9 (95%) khi bổ sung rifamycin thì tỉ lệ sống của *Artemia* bị giảm ở nghiệm thức B6+mnn9+rifa. (80%) nhưng sai biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Ngược lại, việc bổ sung rifamycin ở nghiệm thức LVS2+mnn9 (60%) và LVS8+mnn9 (76%) đã tăng tỉ lệ sống lên đáng kể ($p<0,05$) lần lượt là 95% và 97%. Kết quả này cho thấy rifamycin không giảm tỉ lệ sống của *Artemia* nhưng ngược lại bổ sung rifamycin còn làm tăng tỉ lệ sống của *Artemia* ở một số nghiệm thức.



Hình 1: Tỉ lệ sống (%) của *Artemia* vào ngày nuôi thứ 6

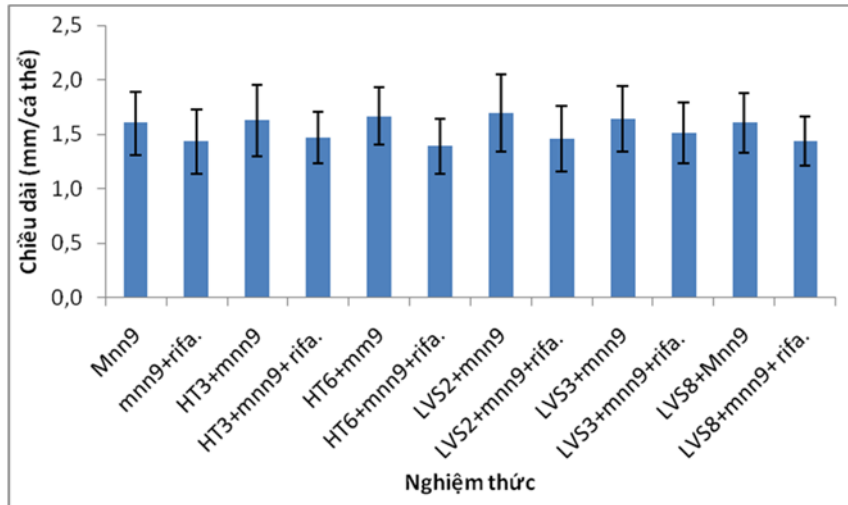
Số liệu trung bình±độ lệch chuẩn. Trung bình có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$)

Chiều dài *Artemia* trung bình sau 6 ngày nuôi dao động từ 1,1-2,0 mm, trong đó *Artemia* được cho ăn nấm men bánh mì mnn9 có chiều dài trung bình là 1,6 mm; tuy nhiên, chiều dài của *Artemia* không tăng nhiều khi được bổ sung vi khuẩn và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) so với nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn. Khi bổ sung rifamycin vào thức ăn, tăng trưởng chiều dài của *Artemia* kém hơn nghiệm thức không bổ sung rifamycin nhưng không sai biệt có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) so với nghiệm thức không bổ sung rifamycin trong cùng điều kiện thức ăn (Hình 2). Kết quả này cho thấy rifamycin được cho vào thức ăn để kiểm chế sự phân chia của vi khuẩn không ảnh hưởng nhiều đến tỉ lệ sống và tăng trưởng chiều dài của *Artemia*.

Theo Toi *et al.* (2014), tỉ lệ sống và phát triển của *Artemia* không bị ảnh hưởng khi sử dụng rifamycin ở nồng độ 5 ppm, kết quả này cũng

tương tự như thí nghiệm hiện tại mặc dầu rifamycin đã sử dụng với nồng độ lên đến 10 ppm. Do thí nghiệm hiện tại thực hiện để đánh giá khả năng hấp thụ dinh dưỡng từ vi khuẩn của *Artemia*, nên rifamycin được sử dụng để kiểm chế sự phân chia của vi khuẩn nhằm đảm bảo xác định N^{15} tích tụ trong *Artemia* và đánh giá khả năng hấp thụ nitrogen của *Artemia* từ vi khuẩn một cách chính xác.

Bảng 2 cho thấy hàm lượng N^{15} tích tụ trong mô của *Artemia* ở nghiệm thức cho ăn bằng nấm men mnn9 đơn thuần (NT1, đối chứng) đạt thấp nhất (0,38%), khi đưa HT3- N^{15} vào thức ăn với các tỉ lệ tăng dần thì hàm lượng N^{15} trong mô của *Artemia* tăng theo mức tăng HT3- N^{15} và đạt giá trị cao nhất (2,12%) khi thay thế hoàn toàn mnn9 bằng HT3- N^{15} . Kết quả thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với nghiệm thức đối chứng ở mức thay thế từ 50% trở lên.



Hình 2: Chiều dài (mm) của Artemia vào ngày nuôi thứ 6

Số liệu trung bình±độ lệch chuẩn

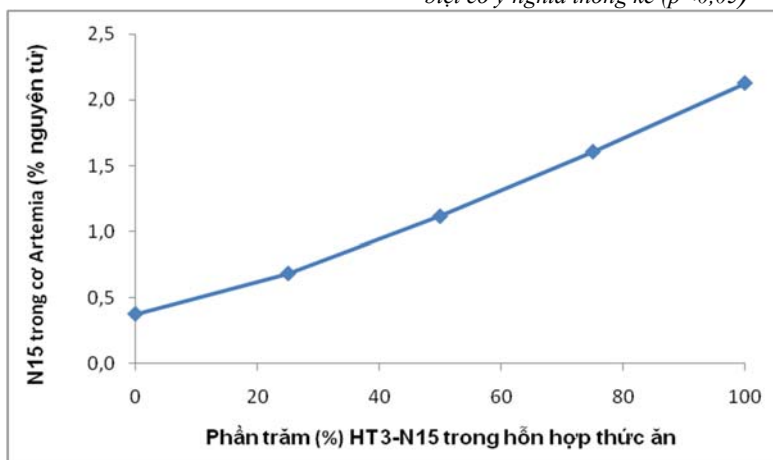
Nhìn chung, kết quả về hấp thụ dinh dưỡng của Artemia từ vi khuẩn thông qua xác định hàm lượng N¹⁵ tích tụ trong mô của Artemia cho thấy từ nghiệm thức 2 khi đưa vào 25% vi khuẩn đánh dấu N¹⁵ trong khẩu phần ăn đến NT3 (50% HT3-N¹⁵) thì hàm lượng N¹⁵ trong mô Artemia tăng nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) giữa hai nghiệm thức này. Sự hiện diện của vi khuẩn càng tăng trong khẩu phần ăn từ nghiệm thức NT4 (75% vi khuẩn) và NT5 (100% vi khuẩn), thì hàm lượng N¹⁵ trong mô Artemia càng tăng có ý nghĩa thống kê (Hình 3). Kết quả này cho thấy Artemia ăn và hấp thụ càng nhiều vi khuẩn khi sự hiện diện của nấm men giảm xuống.

Bảng 2: Hàm lượng N¹⁵ trong thức ăn và trong mô của Artemia

Trong thức ăn	N ¹⁵ (% nguyên tử)
- HT3	0,38±0,01
- HT3-N ¹⁵	10,06±0,03
- mnn9	0,38±0,01
Trong cơ Artemia	
- NT1: 100% mnn9	0,38±0,01 ^a
- NT2: 75% mnn9+25% HT3-N ¹⁵	0,69±0,07 ^{ab}
- NT3: 50% mnn9+50% HT3-N ¹⁵	1,12±0,24 ^b
- NT4: 25% mnn9+75% HT3-N ¹⁵	1,60±0,06 ^c
- NT5: 100% HT3-N ¹⁵	2,13±0,42 ^d

Số liệu trung bình±độ lệch chuẩn

Số liệu trung bình trong cột có chữ khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$)



Hình 3: Mối tương quan giữa phần trăm HT3-N¹⁵ trong thức ăn và hàm lượng N¹⁵ trong cơ của Artemia

Nghiên cứu của Makridis and Vadstein (1999), Moore and Jaeckle (2010) thì hiệu quả lọc (số

lượng lọc được trong một đơn vị thời gian) của Artemia có kích cỡ hạt 12 μm (nấm men và vi tảo)

sẽ cao hơn 69 lần so với cỡ hạt 0,5 µm (vi khuẩn). Sự khác biệt này có thể lý giải vì sao hàm lượng N¹⁵ trong mô của *Artemia* ở NT3 thay thế 50% tăng cao hơn so với NT2 thay thế 25% nấm men bằng vi khuẩn nhưng không khác biệt về mặt thống kê. Từ kết quả của thí nghiệm này đã khẳng định rằng *Artemia* có thể ăn lọc vi khuẩn và hấp thụ dinh dưỡng từ vi khuẩn cho quá trình phát triển của chúng. Cũng nhờ vào phương pháp đánh dấu đồng vị N¹⁵ bên, khả năng hấp thụ nitrogen từ tảo *Nannochloropsis oculata* của rotifer *Brachionus plicatilis* được xác định là 77% tảo đã được ăn lọc vào ruột rotifer, 23% hấp thụ vào cơ, 18% sử dụng cho tăng trưởng và 5% đã thải ra ngoài (Aoki and Hino, 1995); Preston *et al.* (1996) đã sử dụng phương pháp đánh dấu đồng vị bên trên protein tảo *Chaetoceros muelleri* và protein *Artemia*, các loại protein này lần lượt được phối chế trong khẩu phần thức ăn của tôm sú *Penaeus monodon*, sau thời gian nuôi 2 tuần, hàm lượng N¹⁵ trong cơ thịt của tôm sú đã tăng đáng kể, từ đó đưa ra kết luận rằng tôm sú đã hấp thụ dinh dưỡng từ tảo và *Artemia*; N¹⁵ cũng được ứng dụng để đánh dấu trong protein của biofloc trong thí nghiệm nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* (Burford *et al.*, 2004) và cá rô phi (Avnimelech *et al.*, 2009), sau thời gian nuôi thì hàm lượng N¹⁵ trong cơ thịt của tôm và cá đã tăng lên đáng kể, từ đó cho thấy biofloc là thức ăn bổ sung cho cả tôm và cá.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

– Rifamycin có thể sử dụng là chất kìm hãm sự phát triển vi khuẩn với liều lượng 10 ppm không làm giảm tỉ lệ sống và sinh trưởng của *Artemia*, nhưng sử dụng rifamycin còn làm tăng tỉ lệ sống của *Artemia* ở một nghiệm thức.

– Phương pháp đánh dấu đồng vị bên N¹⁵ đã làm sáng tỏ khả năng lọc và hấp thụ dinh dưỡng của *Artemia* từ vi khuẩn, *Artemia* sử dụng nhiều vi khuẩn khi điều kiện thiếu sự hiện diện của nấm men hay thức ăn có kích cỡ tối ưu cho khả năng lọc của *Artemia*.

4.2 Đề xuất

– Trong các nghiên cứu với điều kiện gnotobiotic, rifamycin nên được sử dụng với liều lượng thấp hơn để hạn chế ảnh hưởng đến sự phát triển của sinh vật thí nghiệm.

– Phương pháp đánh dấu đồng vị bên cần được áp dụng trong nghiên cứu sâu về khả năng hấp thụ dinh dưỡng ở một số loài thủy sản tiềm năng khác, nhằm có được những đề xuất về khẩu phần ăn tốt nhất cho sự phát triển của vật nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn quỹ học bổng 332 của Chính Phủ Việt Nam cho nghiên cứu sinh, GS.TS. Patrick Sorgeloos, GS.TS. Peter Bossier, và GS.TS. Gilbert Van Stappen Trường Đại học Ghent đã tận tình giúp đỡ trong quá trình thực hiện thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anh, N. T. N. (2009). Optimisation of *Artemia* biomass production in salt ponds in Vietnam and use as feed ingredient in local aquaculture. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
- Aoki, S. and Hino, A. (1995). Measurements of the nitrogen budget in the rotifer *Brachionus plicatilis* by using ¹⁵N. *Fisheries Science* 61 (3) 406–410.
- Avnimelech, Y. and Kochba, M. (2009). Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using ¹⁵N tracing. *Aquaculture* 287(1-2): 163-168.
- Baert, P., Anh, N. T. N., Quynh, V. D., Hoa, N. V. and Sorgeloos, P., (1997). Increasing cyst yields in *Artemia* culture ponds in Vietnam: the multi-cycle system. *Aquaculture Research* 28 (10): 809-814.
- Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman R. H. and Pearson, D. C., (2004). The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture* 232 (1-4): 525-537.
- Coutteau, P., Lavens P. and Sorgeloos, P., (1990). Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. *Journal of the World Aquaculture Society* 21 (1): 1-9.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B., and Patiño, M., (1996). *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture* 143 (2): 197-204.
- Gorospe, J. N., Nakamura, K., Abe, M. and Higashi, S., (1996). Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. *Fisheries Science* 62 (6): 914-918.
- Intriago, P. and Jones, D. A., (1993). Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 113 (1-2): 115-127.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P., (1991). Chapter XIII: Production of *Artemia* in culture tanks. In: *Artemia Biology*. R.A. Browne, P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (Eds). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA: pp 317-350.
- Makridis, P. and Vadstein, O., (1999). Food size selectivity of *Artemia franciscana* at three developmental stages. *Journal of Plankton Research* 21 (11): 2191-2201.

- Marques, A., Dinh, T., Ioakeimidis, C., Huys, G., Swings, J., Verstraete, W., Dhont, J., Sorgeloos, P. and Bossier, P. (2005). Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (8): 4307-4317.
- Marques, A., Huynh, T. T., Verstraete, W., Dhont, J., Sorgeloos, P. and Bossier, P., (2006). Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334(1): 20-30.
- Moore, K. and Jaeckle, W., (2010). Bacteria not an energetically favorable food source for *Artemiasalina* larvae. Twenty-First Annual Illinois Wesleyan University John Wesley Powell Student Research Conference
- Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Thị Hồng Vân, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Phạm Thị Tuyết Ngân, Huỳnh Thanh Tới, Trần Hữu Lễ, (2007). *Artemia*– Nghiên cứu và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. 134 trang.
- Preston, N. P., Smith, D. M., Kellaway, D. M. and Bunn, S. E., (1996). The use of enriched ¹⁵N as an indicator of the assimilation of individual protein sources from compound diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 147 (3-4): 249-259.
- Ronald, L., Van Stappen, G., Hoa, N. V. and Sorgeloos, P., (2013). Effect of carbon/nitrogen ratio manipulation in feed supplements on *Artemia* production and water quality in solar salt ponds in the Mekong delta, Vietnam. *Aquaculture Research*: 1-7
- Soltanian, S., Dhont, J., Sorgeloos, P. and Bossier, P., (2007). Influence of different yeast cell-wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown *Artemia*. *Fish & Shellfish Immunology* 23 (1): 141-153.
- Sorgeloos, P., Dhert, P. and Candreva, P. (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200 (1-2): 147-159.
- Sui, L. Y., Wang, J., Nguyen, V. H., Sorgeloos, P., Bossier, P. and Stappen, G. (2013). Increased carbon and nitrogen supplementation in *Artemia* culture ponds results in higher cyst yields. *Aquaculture International* 21 (6): 1343-1354.
- Thinh, L.-V., Renaud, S. M. and Parry, D. L. (1999). Evaluation of recently isolated Australian tropical microalgae for the enrichment of the dietary value of brine shrimp, *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 170 (2): 161-173.
- Toi, H. T., Boeckx, P. Sorgeloos, P., Bossier, P. and Van Stappen, G., (2014). Co-feeding of microalgae and bacteria may result in increased N assimilation in *Artemia* as compared to mono-diets, as demonstrated by a ¹⁵N isotope uptake laboratory study. *Aquaculture*, 422: 109-114
- Yasuda, L. and Taga, N., (1980). A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *La mer (Bulletin de la Société franco-japonaise d' oceanographic)* 18: 55-62.