

## ẢNH HƯỞNG CỦA LIỀU LƯỢNG THỨC ĂN PHỐI CHẾ KẾT HỢP VỚI TẢO TỰ NHIÊN LÊN TỶ LỆ SỐNG, SINH TRƯỞNG VÀ SINH SẢN CỦA *ARTEMIA FRANCISCANA* VĨNH CHÂU TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Trần Hữu Lễ, Phạm Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Văn Hòa  
Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ

Liên hệ email: [thle@ctu.edu.vn](mailto:thle@ctu.edu.vn)

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của việc bổ sung thức ăn chế biến với các liều lượng khác nhau kết hợp với tảo tự nhiên lên tỷ lệ sống, sinh trưởng và các chỉ tiêu sinh sản của *Artemia franciscana* dòng Vĩnh Châu. Thí nghiệm được bố trí với 5 nghiệm thức. Nghiệm thức 1 (NT1): sử dụng 100% thức ăn là tảo tự nhiên; Nghiệm thức 2 (NT2): tảo tự nhiên + 10% thức ăn chế biến; Nghiệm thức 3 (NT3): tảo tự nhiên + 20% thức ăn chế biến; Nghiệm thức 4 (NT4): tảo tự nhiên + 30% thức ăn chế biến; Nghiệm thức 5 (NT5): tảo tự nhiên + 40% thức ăn chế biến. Lượng tảo tự nhiên được cung cấp làm thức ăn cho *Artemia* mỗi ngày với mật độ tảo được duy trì 2 triệu tế bào (tb)/mL. Nghiên cứu được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm với mật độ bố trí là 100 con/lít, sử dụng nước biển có độ mặn 80‰. Sau 14 ngày nuôi thí nghiệm, kết quả cho thấy tỷ lệ sống ở tất cả các nghiệm thức đều đạt trên 81,5%, trong đó NT2 (tảo tự nhiên + 10% thức ăn chế biến) có tỷ lệ sống cao nhất (100%). Tuy nhiên, về tốc độ tăng trưởng và các chỉ tiêu sinh sản đều đạt cao nhất ở NT5 (tảo tự nhiên + 40% thức ăn chế biến) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0.05$ ) so với các nghiệm thức còn lại.

**Từ khóa:** *Artemia franciscana*, thức ăn chế biến, tảo tự nhiên, tăng trưởng và sức sinh sản.

Nhận bài: 09/05/2018

Hoàn thành phản biện: 30/05/2018

Chấp nhận bài: 05/06/2018

### 1. MỞ ĐẦU

*Artemia franciscana* là một loài giáp xác, có tính ăn lọc không chọn lựa, thức ăn phổ biến bao gồm các loại: tảo đơn bào, mùn bã hữu cơ, vi khuẩn (Sorgeloos và cs., 1986), tùy theo giai đoạn phát triển chúng có khả năng lọc các hạt thức ăn có kích thước từ vài micromet (1/1000 mm) đến nhỏ hơn 50 micromet. *Artemia* là loại thức ăn tươi sống có giá trị dinh dưỡng cao và ấu trùng *Artemia* là loại thức ăn được sử dụng rộng rãi nhất trong các loại thức ăn tươi sống dùng trong ương nuôi ấu trùng tôm cá, vì vậy chúng đóng vai trò rất quan trọng trong ngành nuôi trồng thủy sản (Van Stappen, 1996; Nguyễn Văn Hòa và cs., 2007).

Từ thập niên 30 của thế kỷ trước người ta đã phát hiện và nghiên cứu đối tượng này, đến những năm 1980 thì nhiều quốc gia bắt đầu phát triển việc thả nuôi *Artemia* như Indonesia, Philippines, Thái Lan, Việt Nam, Ecuador, Brazil (Sorgeloos và cs., 1986; Nguyễn Văn Hòa và cs., 2007), tuy nhiên phần lớn việc gây nuôi không thành công ngoại trừ ở Việt Nam.

Mặc dù kỹ thuật nuôi *Artemia* đã được chuyên giao cho nông dân để sản xuất đại trà từ năm 1990, cho đến nay thì kỹ thuật canh tác của người dân cũng chưa có nhiều thay đổi so với thời gian đầu, số liệu thống kê toàn vùng ven biển Sóc Trăng, Bạc Liêu các năm gần đây cho thấy năng suất trung bình trứng bào xác *Artemia* chỉ đạt từ 50 - 70 kg/ha/vụ, nguyên nhân chủ yếu là do đa số người nuôi *Artemia* nơi đây vẫn còn duy trì quy trình kỹ thuật nuôi theo truyền thống như việc cung cấp thức ăn cho ao nuôi *Artemia* chủ yếu từ nguồn nước xanh tự nhiên từ các ao lã, ao trữ nước hay ao bón phân hoặc sử dụng phân gà trực tiếp vào ao nuôi *Artemia* để làm thức ăn trực tiếp hay để gây màu nước trong ao bón phân, hoặc một số hộ có

sử dụng thức ăn bổ sung sẵn có tại địa phương như cám gạo, bột mì, bột bắp... Tuy nhiên, hiệu quả thức ăn sử dụng rất hạn chế.

Mặt khác, về kỹ thuật nuôi do ao nuôi *Artemia* luôn phải luôn được duy trì độ mặn từ 80 - 100‰, trong khi thể tích ao nuôi nhỏ (ao cạn) nên không thể cung cấp nhiều nước xanh có độ mặn thấp (khoảng 20 - 35‰) từ các ao lã, ao bón phân vào ao nuôi để tránh bị giảm độ mặn. Thông thường ao nuôi *Artemia* chỉ được cấp nước xanh từ 1 - 2 cm/ngày, cho nên lượng thức ăn tự nhiên luôn bị thiếu hụt (*Artemia* phát triển chậm, khi trưởng thành thì con cái mang trứng ít, quần thể mau suy tàn...). Bên cạnh đó, theo cách nuôi truyền thống là qui trình khép kín, ít thay nước hay việc sử dụng thức ăn bổ sung (cám gạo, bột bắp, bột sắn...) hoặc sử dụng trực tiếp phân gà quá nhiều vào ao nuôi *Artemia* có thể xảy ra một số vấn đề đối với môi trường do sự tích tụ của các chất hữu cơ, có thể làm ô nhiễm nguồn nước, ô nhiễm nền đáy ao. Đối với người nuôi khi dịch cúm gia cầm xảy ra thì việc sử dụng phân gà sẽ ảnh hưởng đến sức khỏe nên họ hạn chế sử dụng, hậu quả là làm giảm đáng kể năng suất trứng *Artemia* (Vũ Ngọc Út và cs., 2008; Quảng Thị Mỹ Duyên, 2012). Từ đó cho thấy việc quản lý và sử dụng nguồn thức ăn của người nuôi cho ao nuôi *Artemia* hiện nay chưa thật sự chủ động và hiệu quả thấp, nên rất cần được cải thiện.

Thực tế qua nhiều năm cho thấy khi ao nuôi *Artemia* được cung cấp đủ thức ăn trong suốt thời gian nuôi thì năng suất trứng bào xác gia tăng đáng kể (Trần Hữu Lễ, 2013). Qua các thử nghiệm thăm dò trên bề 500 lít tại Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ cho thấy khi nuôi *Artemia* sử dụng 100% thức ăn chế biến cho kết quả về sinh trưởng và sinh sản của *Artemia* rất tốt (Nguyễn Thị Kim Phượng, 2012) hay theo một nghiên cứu khác (Coutteau và cs., 1997) thì *Artemia* phát triển bình thường khi được thay thế đến 75% tảo bằng thức ăn nhân tạo, hoặc khi sử dụng bổ sung thức ăn tôm sú số 0 với liều lượng (5kg/ha/ngày) trong ao nuôi *Artemia* sẽ cho năng suất trứng bào xác *Artemia* 157kg/ha/vụ (Trần Hữu Lễ, 2013).

Vì lẽ đó, việc nghiên cứu nhằm đưa ra được chế độ thức ăn chế biến bổ sung phù hợp cho sự sinh trưởng và sinh sản của *Artemia*, từ đó có thể chủ động và khắc phục được tình trạng thiếu hụt thức ăn trong ao nuôi *Artemia*, từng bước cải thiện năng suất thu hoạch trứng bào xác *Artemia* trong ao nuôi.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu nuôi *Artemia* được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm nhằm để đánh giá ảnh hưởng của của liều lượng thức ăn chế biến bổ sung kết hợp với tảo tự nhiên lên tăng trưởng và tỷ lệ sống và sức sinh sản của *Artemia*.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nguồn giống: *Artemia franciscana* Vĩnh Châu, sản phẩm của Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ.

Nguồn nước mặn: Nước ót 80‰ được vận chuyển từ ruộng muối vùng ven biển Vĩnh Châu, Sóc Trăng.

Nguồn tảo làm thức ăn tự nhiên cho *Artemia*: Tảo tự nhiên được lấy từ các ao bón phân tại Trại thực nghiệm *Artemia franciscana* Vĩnh Châu, Sóc Trăng, sau đó nước được lọc qua lưới 50 µm để loại bỏ động vật phù du và tảo có kích thước lớn và cô đặc tảo bằng máy ly tâm.

Nguồn thức ăn chế biến: Thức ăn chế biến được phối chế theo công thức được nghiên cứu bởi Dương Thị Mỹ Hận và cs. (2016)

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm nuôi *Artemia* được thực hiện trong chai nhựa có thể tích 1 lít, gồm 5 nghiệm thức (NT), mỗi nghiệm thức được lặp lại 4 lần, mật độ thả giống *Artemia* lúc ban đầu 100 con/L, độ mặn luôn giữ ổn định ở mức 80‰, sục khí nhẹ liên tục để đảm bảo đầy đủ oxy cho *Artemia*.

NT1: Chỉ cấp tảo tự nhiên

NT2: Tảo tự nhiên + 10% thức ăn chế biến.

NT3: Tảo tự nhiên + 20% thức ăn chế biến.

NT4: Tảo tự nhiên + 30% thức ăn chế biến.

NT5: Tảo tự nhiên + 40% thức ăn chế biến.

Thí nghiệm được tiến hành với 2 giai đoạn nuôi:

Giai đoạn 1: Nuôi chung *Artemia* đến giai đoạn thành thực để đánh giá tỷ lệ sống và tăng trưởng.

Giai đoạn 2: Khi quần thể *Artemia* đạt giai đoạn thành thực khoảng 80% thì tiến hành nuôi riêng từng cặp cá thể bằng cách bắt ngẫu nhiên ở mỗi nghiệm thức 30 cặp (chọn cặp *Artemia* đực và cái đang bắt cặp), mỗi cặp được nuôi trong ống falcon 50 ml để theo dõi các chỉ tiêu sinh sản và tuổi thọ.

Phương pháp chăm sóc và cho ăn: Cả 2 giai đoạn đều cho ăn tảo tự nhiên kết hợp với thức ăn chế biến theo từng nghiệm thức. Tảo ly tâm từ ao bón phân được bảo quản trong tủ lạnh, mật độ tảo luôn duy trì ở mức 2 triệu tb/mL. Lượng thức ăn tảo tự nhiên (tảo tạp) được cung cấp mỗi ngày bằng 10% lượng nước trong bể nuôi cho tất cả các nghiệm thức. Thức ăn chế biến được tính toán, cân, lọc qua vợt 50  $\mu$ m và pha loãng trước khi cho *Artemia* ăn 4 lần/ngày (8 h, 11 h, 14 h và 17 h). Lượng thức ăn chế biến được bổ sung tương ứng với 10%, 20%, 30% và 40% lượng thức ăn theo bảng khẩu phần thức ăn tiêu chuẩn cho 1 con *Artemia* của Nguyễn Văn Hòa (1993) (Bảng 1).

Trong giai đoạn 2, chế độ cho ăn và chăm sóc tương tự như giai đoạn 1. Tuy nhiên, hàng ngày quan sát từng ống falcon khi thấy có nauplii hoặc trứng bào xác hiện diện, tiến hành tách ra và đếm toàn bộ số trứng và nauplii, ghi nhận các chỉ tiêu về sức sinh sản.

**Bảng 1.** Khẩu phần thức ăn tiêu chuẩn cho 1 cá thể *Artemia* được tính theo khối lượng khô

Ngày	Lượng (mg)
1	0,0154
2,3,4	0,0305
5,6	0,0462
7	0,0610
8	0,0776
9	0,1256
10,11	0,1478
12,13	0,1847
14,15	0,2215
16,17	0,2586
18,19	0,3140
20 trở đi	0,3694

(Nguyễn Văn Hòa, 1993)

Phương pháp định tính và định lượng tảo:

Phương pháp định tính: Mẫu tảo ly tâm, pha loãng 100 lần sau đó dùng pipet hút 1 giọt cho vào lamme và lamelle, quan sát với kính hiển vi có độ phóng đại 40x để xác định giống loài, định danh dựa theo Shirota (1966).

Phương pháp định lượng: Mẫu tảo ly tâm, pha loãng  $10^4$  sau đó sử dụng buồng đếm Buker để xác định tảo có kích thước nhỏ hơn 50  $\mu\text{m}$ . Mật độ tảo được tính theo công thức (Lavens and Sorgeloss, 1996):

$$\text{Mật độ tảo (tb/mL)} = (N1 + N2)/160 \times 10^6 \times 10^4$$

Trong đó: N1: Số lượng tế bào tảo đếm ở phần trên.

N2: Số lượng tế bào tảo đếm ở phần dưới.

$10^4$ : Hệ số pha loãng

Thu nhập số liệu:

Giai đoạn 1: Thu nhập số liệu môi trường, tỷ lệ sống và tăng trưởng của *Artemia*.

Theo dõi nhiệt độ bằng nhiệt kế ( $^{\circ}\text{C}$ ) và pH bằng bút đo pH điện tử. Ghi nhận vào thời điểm 8 giờ và 14 giờ mỗi ngày. Hàm lượng  $\text{NO}_2$  và  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  được xác định bằng bộ test sera (Đức) với chu kỳ 3 ngày/lần ở thí nghiệm nuôi chung.

Thu số liệu về tỷ lệ sống, tăng trưởng của *Artemia* được xác định vào ngày 7 và 14. Tỷ lệ sống (%) được xác định bằng cách đếm tất cả số *Artemia* tại thời điểm thu mẫu so với số *Artemia* thả ban đầu. Chiều dài của *Artemia* được xác định bằng cách bắt ngẫu nhiên 30 con ở mỗi nghiệm thức sau đó cố định *Artemia* bằng lugol. Tiến hành đo chiều dài bằng kính hiển vi. Cách đo từ đỉnh đầu của *Artemia* đến điểm cuối của đuôi.

Giai đoạn 2: Thu nhập các số liệu về dòng đời và sức sinh sản của *Artemia*.

Thời gian tiền sinh sản: Thời gian từ khi nuôi đến lứa đẻ đầu tiên.

Thời gian sinh sản: Thời gian từ khi con cái bắt đầu đẻ cho đến lần đẻ cuối cùng.

Tuổi thọ: Tính từ lúc *Artemia* mới nở đến lúc chết.

Tổng số phôi/con cái: Tổng số trứng bào xác và nauplii được sinh ra bởi 1 con cái trong vòng đời.

Tổng số trứng bào xác/con cái: Tổng số trứng bào xác trong vòng đời của 1 con cái.

Tổng số nauplii/con cái: Tổng số nauplii trong vòng đời của con cái.

Số lứa đẻ: Tổng số lần đẻ của con cái trong vòng đời.

Khoảng cách giữa hai lần sinh sản (chu kì sinh sản): Thời gian giữa hai lần sinh sản của con cái.

Sức sinh sản: Bình quân số phôi/ lần đẻ của con cái.

Số trứng bào xác/lứa: Bình quân số trứng bào xác/ lần đẻ của con cái.

Số nauplii/lứa: Bình quân số ấu trùng/ lần đẻ của con cái.

### 2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu sẽ được tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn bằng phần mềm Excel 2013. Phân tích ANOVA tìm sự khác biệt giữa các trung bình nghiệm thức bằng phép thử DUNCAN ở mức ý nghĩa ( $p < 0.05$ ) sử dụng phần mềm SPSS 16.0.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Các yếu tố môi trường

Kết quả thí nghiệm cho thấy nhiệt độ của các nghiệm thức dao động từ 26 - 27 $^{\circ}\text{C}$  (buổi sáng) và từ 25.8 - 26 $^{\circ}\text{C}$  (buổi chiều) nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển của *Artemia*. Theo Nguyễn Văn Hòa và cs. (2007) cho rằng nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng cũng

nư sinh sản của *Artemia*. Nhiệt độ quá thấp < 20°C *Artemia* sẽ sinh trưởng chậm hoặc chết rải rác và ngược lại nhiệt độ > 36°C gây ra hiện tượng chết rải rác, giảm khả năng sinh sản và quần thể phục hồi rất chậm. Nhiệt độ thích hợp cho *Artemia franciscana* Vĩnh Châu là khoảng 25 - 30°C (Nguyễn Văn Hòa và cs.,2007), tuy nhiên thực tế cho thấy đối với *Artemia franciscana* Vĩnh Châu khi được thả nuôi trong ao ngoài tự nhiên thì nhiệt độ nước nằm trong khoảng 25 - 35°C là khoảng thời gian mà quần thể *Artemia* trong ao khỏe mạnh nhất và khả năng thu hoạch trứng bào xác cao nhất.

**Bảng 2.** Giá trị trung bình của các yếu tố môi trường trong từng nghiệm thức

Các chỉ tiêu theo dõi		Nghiệm thức				
		NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Nhiệt độ (°C)	Sáng	26,1 ± 1,0	27,0 ± 1,0	26,0 ± 1,1	26,1 ± 1,0	26,0 ± 1,0
	Chiều	26,0 ± 0,9	25,9 ± 0,9	26,0 ± 0,9	25,9 ± 0,9	25,8 ± 0,9
pH	Sáng	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1
	Chiều	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub> (mg/L)		0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)		0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,0

Biến động pH trong ngày của các nghiệm thức trong suốt quá trình nuôi không lớn, dao động từ 7,3 - 7,4 (buổi sáng) và ổn định 7,3 (buổi chiều), nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển của *Artemia*. pH ảnh hưởng đến sinh trưởng, tỷ lệ sống, sinh sản và dinh dưỡng của thủy sinh vật, theo Boyd. (1990) pH thích hợp cho các loài thủy sản là 6,5 - 9, tối ưu là 7,5 - 8,5.

Theo Wear và Haslett (1986), khi độ mặn thấp sẽ có nhiều địch hại và nhiều loài tảo không thích hợp xuất hiện, khi độ mặn tăng cao sẽ hạn chế sức sản xuất sơ cấp trong ao nuôi, hoặc làm giảm hiệu quả lọc thức ăn của *Artemia*, hơn nữa khi độ mặn tăng cao thì nhiệt độ cao và hàm lượng oxy giảm, gây stress cho *Artemia*, hậu quả là chúng tăng trưởng chậm, sức sinh sản giảm, mức độ phụ hồi quần thể thấp, nếu quá ngưỡng sẽ gây chết hàng loạt (Vanhaeck và Sorgeloos khoảng 0,2 - 0,3 mg, 1989). Nghiên cứu khác cho thấy ở độ mặn 120‰ thì sức sinh sản và năng suất trứng *Artemia* thấp hơn nhiều so với nuôi ở độ mặn 80‰ (Nguyễn Văn Hoà, 2005). Vì vậy, độ mặn 80‰ được giữ ổn định trong suốt quá trình nuôi vì đây là độ mặn tối ưu cho *Artemia* sinh trưởng và phát triển.

Nhìn chung hàm lượng NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dao động từ 0,01 - 0,02 mg/L nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển *Artemia*. Hàm lượng NO<sub>2</sub><sup>-</sup> > 0,1 mg/L có thể gây độc cho thủy sản. Độ độc của NO<sub>2</sub><sup>-</sup> tăng nhanh khi pH giảm, nhiệt độ tăng và lượng oxy hòa tan giảm. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> là một khí độc, độc hơn NH<sub>3</sub> rất nhiều, chỉ lượng rất thấp vẫn ảnh hưởng lên đối tượng nuôi thủy sản. Hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> dao động từ 0,2 - 0,3 mg/L vẫn nằm trong khoảng thích hợp cho *Artemia*.

### 3.2. Tỷ lệ sống và tăng trưởng của *Artemia*

Tỷ lệ sống của *Artemia* sau 7 và 14 ngày nuôi ở 5 nghiệm thức có kết hợp thức ăn bổ sung kết hợp với tảo tự nhiên đều cho tỷ lệ sống rất cao (Bảng 3). Tỷ lệ sống ở 7 ngày đầu dao động từ 91,5 - 100%. Cao nhất là NT1 và NT2 đều đạt 100%, tiếp đến là NT3 đạt 99,5%, NT4 là 95,5%, thấp nhất NT5 là 91,5 ± 9,95% và có khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05). Tỷ lệ sống sau 14 ngày nuôi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05), NT2 có tỷ lệ sống cao nhất (100,00 ± 0,0%), tiếp đến là NT3 (98,8 ± 2,5%), NT4 (93,3 ± 6,24%), NT1 (86,8 ± 9,25%) và thấp nhất là NT 5 (81,5 ± 14,4%).

**Bảng 3.** Tỷ lệ sống của *Artemia* trong từng nghiệm thức thí nghiệm

	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Ngày 1	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Ngày 7	100,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	99,5 ± 1,00 <sup>b</sup>	95,5 ± 4,20 <sup>ab</sup>	91,5 ± 9,95 <sup>a</sup>
Ngày 14	86,75 ± 9,25 <sup>ab</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	98,75 ± 2,50 <sup>b</sup>	93,25 ± 6,24 <sup>ab</sup>	81,50 ± 14,40 <sup>a</sup>

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

Giữa các các nghiệm thức thí nghiệm cũng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ sống của *Artemia* khi được bổ sung thức ăn chế biến ở các mức độ khác nhau. Kết quả về tỷ lệ sống của *Artemia* trong thí nghiệm và đặc biệt ở NT2 (cho ăn tảo tự nhiên + 10% thức ăn chế biến) cho thấy có sự tương đồng hoặc đạt cao hơn rất nhiều so với một số kết quả thí nghiệm trước đây như kết quả thí nghiệm của Huỳnh Thanh Tới và cs. (2006), nuôi *Artemia* với mật độ 500 nauplii/L, độ mặn 80% và sử dụng 3 loài tảo *Chaetoceros calcitrans*, *Nitzschia* sp. và *Oscillatoria* sp. với 3 liều lượng cho ăn khác nhau, sau 10 ngày nuôi thì tỷ lệ sống đạt cao nhất (85,5 ± 0,4%) khi cho ăn tảo *Chaetoceros calcitrans*. Theo Nguyễn Thị Kim Phụng và cs. (2013) khi sử dụng 100% tảo *Chaetoceros* sp. sau 10 ngày nuôi tỷ lệ sống đạt 88,0 ± 2,40% và 100% thức ăn tôm số 0 là 85,3 ± 47,1%; Lora-Vilchis và cs. (2004), sử dụng hai loài tảo *Isochrysis* sp. và *Chaetoceros muelleri* làm thức ăn trong giai đoạn đầu của *Artemia*, kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi tỉ lệ sống của *Artemia* ở nghiệm thức cho *Artemia* ăn bằng tảo *Isochrysis* sp. tỉ lệ sống đạt 85% trong khi *Artemia* cho ăn tảo *Chaetoceros muelleri* có tỉ lệ sống là 93%. Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt này có thể là do *Artemia* được bổ sung lượng thức ăn chế biến trong quá trình nuôi thí nghiệm bên cạnh thức ăn chính là tảo.

**Bảng 4:** Kết quả tăng trưởng (mm) của *Artemia* sau 7 và 14 ngày nuôi

	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Ngày 1	0,50 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,31 <sup>a</sup>
Ngày 7	2,20 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,13 <sup>a</sup>
Ngày 14	4,05 ± 0,28 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,24 <sup>b</sup>	6,35 ± 0,16 <sup>c</sup>	7,20 ± 0,67 <sup>d</sup>	7,98 ± 0,20 <sup>e</sup>

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

Tăng trưởng của *Artemia* ở 7 ngày đầu tiên tăng trưởng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên sau 14 ngày nuôi thì có sự khác biệt rõ rệt ( $p < 0,05$ ) và dao động trong khoảng 4,05 - 7,98 mm, trong đó ở NT5 có chiều dài cao nhất (7,98 ± 0,20 mm) và thấp nhất là NT1 (4,05 ± 0,27 mm). Chiều dài *Artemia* ở NT4 và NT5 trong thí nghiệm khá cao và tương đồng với kết quả thí nghiệm của Nguyễn Thị Kim Phụng và Nguyễn Văn Hòa (2013) ở nghiệm thức cho ăn 100% tảo tươi đạt chiều dài ở mức 7,54 ± 0,48 mm hay ở thí nghiệm của Trần Thị Lam Khoa (2016), khi sử dụng thức ăn là biofloc sau khi lọc qua lưới 50 µm, sau 14 ngày nuôi chiều dài *Artemia* đạt 7,81 ± 0,08 mm và Dương Thị Mỹ Hân (2016), sau 14 ngày nuôi sử dụng thức ăn chế biến 30% đậm đạt chiều dài *Artemia* 7,86 ± 0,4 mm. Kết quả về tăng trưởng của thí nghiệm cho thấy khi *Artemia* sẽ có tăng trưởng tốt nhất khi được cung cấp thức ăn là tảo tự nhiên mỗi ngày bằng 10% thể tích nước nuôi với mật độ tảo 2 triệu tb/mL và bổ sung thức ăn chế biến với liều lượng bằng 40% dựa theo bảng khẩu phần thức ăn tiêu chuẩn cho 1 cá thể *Artemia* được tính theo khối lượng khô (Nguyễn Văn Hòa, 1993).

### 3.3. Thời gian sinh sản và vòng đời của *Artemia*

Thời gian tiền sinh sản phụ thuộc rất lớn vào nhiệt độ và dinh dưỡng thức ăn cho *Artemia*, khi nhiệt độ cao và thức ăn được cung cấp đầy đủ về số lượng và chất lượng thì thời

gian tiền sinh sản sẽ ngắn hơn và ngược lại. Thời gian tiền sinh sản ở các nghiệm thức thí nghiệm dao động khá lớn từ 0 - 24,5 ngày, trong đó cao nhất là ở NT2 ( $24,5 \pm 0,56$  ngày) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Kết quả này (ngoại trừ NT1) đều cao hơn các nghiên cứu trước đây như của Nguyễn Thị Ngọc Anh (2014), thời gian tiền sinh sản của *Artemia* Vĩnh Châu nuôi ở nhiệt độ 26 °C là 18,6 ngày và 30 °C là 17,7 ngày khi sử dụng thức ăn là tảo *Dunaliella tertiolecta* và Lansy PZ. Theo Dương Thị Mỹ Hân (2016), trong suốt quá trình thí nghiệm, nhiệt độ trung bình dao động trong khoảng 28,3 - 28,9 °C, thời gian tiền sinh sản từ 9,7 - 15,2 ngày khi sử dụng thức ăn chế biến có hàm lượng đạm từ 20 - 45%. Điều này cho thấy thời gian tiền sinh sản phụ thuộc rất lớn vào nhiệt độ.

**Bảng 5:** Kết quả vòng đời của *Artemia* (ngày)

	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Thời gian tiền sinh sản	$0,0 \pm 0,0^a$	$24,5 \pm 0,6^c$	$20,4 \pm 0,6^b$	$19,9 \pm 0,5^b$	$19,8 \pm 1,1^b$
Thời gian sinh sản	$0,0 \pm 0,0^a$	$15,7 \pm 0,2^c$	$16,2 \pm 0,3^c$	$15,9 \pm 1,0^c$	$13,9 \pm 0,3^b$
Tuổi thọ	$23,7 \pm 0,8^a$	$39,8 \pm 0,6^c$	$39,5 \pm 0,5^c$	$34,1 \pm 1,5^b$	$35,9 \pm 3,3^b$

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

Thời gian sinh sản ở các nghiệm thức dao động từ 0 - 16,2 ngày, trong đó cao nhất là NT3 ( $16,2 \pm 0,26$  ngày) và thấp nhất là NT 1 ( $0,00 \pm 0,00$  ngày). Ở các NT2, NT3, NT4 khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), nhưng khác biệt có ý nghĩa so với 2 nghiệm thức còn lại (NT1 và NT5). Kết quả trên khá tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Văn Hòa và cs. (2014), khi cho ăn bằng tảo tạp và bio-floc thì thời gian sinh sản dao động từ 13,3 - 20,3 ngày do hàm lượng dinh dưỡng trong tảo tạp không cao như trong tảo thuần và thức ăn chế biến nên ảnh hưởng đến tuổi thọ cũng như thời gian sinh sản của *Artemia*.

Tuổi thọ của con cái ở các nghiệm thức dao động từ 23,7 - 39,8 ngày. Trong đó cao nhất là NT2 và NT3 ( $39,8 \pm 0,59$  ngày và  $39,5 \pm 0,47$  ngày), thấp nhất là NT1 ( $23,7 \pm 0,78$  ngày) và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Kết quả này thấp hơn nhiều so với những nghiên cứu trước đây như Nguyễn Thị Kim Phương và Nguyễn Văn Hòa (2013), tuổi thọ con cái ở nghiệm thức sử dụng 100% tảo *Chaetoceros* và nghiệm thức sử dụng 100% thức ăn tôm số 0 lần lượt là  $68,0 \pm 5,20$ ;  $61,9 \pm 4,70$  ngày. Theo Sorgeloos (1980) cho rằng tuổi thọ của *Artemia* cái có liên quan rất nhiều đến thời gian tham gia sinh sản và các chỉ tiêu sinh sản khác. Khi *Artemia* cái được nuôi trong điều kiện tối ưu như môi trường nuôi và thức ăn phù hợp thì chúng có tuổi thọ cao và có cơ hội sinh sản ra nhiều thế hệ con hơn so với *Artemia* cái có tuổi thọ ngắn.

### 3.4. Các chỉ tiêu sinh sản của *Artemia*

Các chỉ tiêu về sinh sản như tổng số phôi được sinh ra trong vòng đời của con *Artemia* cái là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá về điều kiện nuôi, dinh dưỡng thức ăn lên khả năng sinh sản của *Artemia* (Sorgeloos và cs., 1986). Trong nghiên cứu này, ngoại trừ NT1 thì các chỉ tiêu về sinh sản nhìn chung khá cao ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm còn lại, đặc biệt ở NT5 (cho ăn tảo tự nhiên + 40% thức ăn chế biến) đạt kết quả cao nhất ở hầu hết các chỉ tiêu sinh sản và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Từ kết quả trên cho thấy khi nuôi *Artemia* thu trứng bào xác thì ngoài tảo tự nhiên được cung cấp làm thức ăn chính cho *Artemia* thì cần phải bổ sung thêm lượng thức ăn chế biến để đáp ứng đầy đủ dinh dưỡng cả về số lượng và chất lượng thì *Artemia* mới có khả năng sản xuất trứng bào xác cao và ngược lại như ở NT1 (chỉ cung cấp tảo tự nhiên) thì không có *Artemia* tham gia sinh sản, điều này có thể là do lượng tảo tự nhiên được cung cấp ở mức 10% thể tích nuôi

chưa đủ chất dinh dưỡng cho *Artemia* khi được nuôi với mật độ 100 con/L, nên cần phải bổ sung thêm thức ăn chế biến.

Bên cạnh đó, kết quả thí nghiệm cho thấy chu kỳ sinh sản của các nghiệm thức không có sự chênh lệch lớn, tuy nhiên khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), dao động trong khoảng 3,43 - 5,23 ngày/lần. Kết quả thí nghiệm trên khá tương đồng với kết quả của các thí nghiệm trước đây. Theo Sorgeloos và cs. (1986) thì tốc độ sinh sản của *Artemia* là 4 ngày/lần. Nhưng theo nghiên cứu của Ngô Thị Thu Thảo và Vũ Đỗ Quỳnh (1991), một lứa đẻ hình thành trong thời gian là 5 ngày. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Vân (2010), khi sử dụng thức ăn là tảo thuần *Chaetoceros* sp là  $4,09 \pm 1,29$  ngày/lần.

Sức sinh sản (số phôi/lứa đẻ) là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng sinh sản của một loài trong một điều kiện nuôi nhất định nào đó và đặc biệt là tổng số bào xác/con cái. Qua kết quả về sức sinh sản của thí nghiệm (Bảng 6) cho thấy ở NT5 là rất cao ( $126,4 \pm 0,45$  phôi/lứa) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức còn lại, kết quả này cao hơn cả các thí nghiệm về nuôi *Artemia* thu trứng bào xác trước đây như thí nghiệm của Nguyễn Thị Hồng Vân (2010), sử dụng thức ăn là tảo tươi *Chaetoceros* sp. ( $84 \pm 26$  phôi/lứa), Lê Trung Tâm (2013), khi nuôi *Artemia* với Lansy kết hợp với tảo *Chaetoceros* sp. ( $97,4 \pm 9,4$  phôi/lứa), Huỳnh Thanh Tới và cs. (2006), khi nuôi *Artemia* với nhiều loài tảo khác nhau làm thức ăn thì nghiệm thức nuôi bằng tảo *Chaetoceros* sp. cho sức sinh sản  $120 \pm 48$  phôi/lứa.

**Bảng 6.** Bảng kết quả các chỉ tiêu sinh sản của *Artemia*

	NT2	NT3	NT4	NT5
Tổng số phôi/con cái	$337,5 \pm 2,15^c$	$328,8 \pm 0,70^b$	$356,3 \pm 0,70^d$	$476,5 \pm 1,87^e$
Tổng số bào xác/con cái	$161,7 \pm 2,55^d$	$146,2 \pm 1,75^c$	$112,1 \pm 2,37^b$	$229,0 \pm 1,41^e$
Tổng số nauplii/con cái	$175,9 \pm 0,74^b$	$181,2 \pm 1,09^c$	$244,1 \pm 0,99^d$	$247,0 \pm 1,22^e$
Số lứa đẻ	$5,14 \pm 0,08^e$	$4,64 \pm 0,08^d$	$4,27 \pm 0,88^c$	$3,77 \pm 0,09^b$
Số bào xác/lứa	$28,1 \pm 0,84^b$	$31,3 \pm 0,30^c$	$28,3 \pm 2,79^b$	$57,4 \pm 0,92^d$
Số nauplii/lứa	$30,0 \pm 0,89^b$	$38,3 \pm 0,47^c$	$56,9 \pm 0,93^d$	$65,5 \pm 0,26^e$
Sức sinh sản	$58,3 \pm 1,07^b$	$69,5 \pm 0,49^c$	$85,5 \pm 0,37^d$	$126,4 \pm 0,45^e$
Chu kỳ sinh sản	$3,43 \pm 0,02^b$	$4,40 \pm 0,03^d$	$3,84 \pm 0,04^c$	$5,23 \pm 0,03^e$
Tỷ lệ % trứng bào xác	$47,6 \pm 0,35^c$	$51,1 \pm 0,48^b$	$31,7 \pm 0,33^b$	$47,3 \pm 0,50^c$
Tỷ lệ % nauplii	$52,5 \pm 0,31^c$	$48,9 \pm 0,31^b$	$68,3 \pm 0,70^d$	$52,6 \pm 0,54^c$

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

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1. Kết luận

Khi nuôi *Artemia* sử dụng thức ăn là tảo tự nhiên ở mật độ 2 triệu tế bào/mL (được cấp mỗi ngày bằng 10% thể tích nước nuôi *Artemia*) và bổ sung thức ăn chế biến ở mức 40% (tính theo khẩu phần thức ăn tiêu chuẩn cho 1 cá thể *Artemia* của Nguyễn Văn Hòa, 1993) cho thấy sức sinh sản và tăng trưởng của *Artemia* đạt cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức không có bổ sung thức ăn chế biến hoặc có bổ sung nhưng ở mức độ thấp hơn.

### 4.2. Đề xuất

Cần thực hiện các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo trong ao đất để đánh giá hiệu quả kinh tế trong sản xuất nuôi *Artemia* thu trứng bào xác trong ao nuôi.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### 1. Tài liệu tiếng Việt

- Quang Thị Mỹ Duyên. (2012). Khảo sát hiện trạng nuôi Artemia trên ruộng muối ở Bạc Liêu và Sóc Trăng. *Luận văn Thạc sĩ về Nuôi trồng thủy sản*. Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ.
- Trần Hữu Lễ. (2013). Nghiên cứu ảnh hưởng việc bổ sung thức ăn và sự sục khí trong nuôi thâm canh Artemia thu trứng bào xác trên ruộng muối. *Luận văn tốt nghiệp cao học chuyên ngành nuôi trồng thủy sản*, . Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.
- Dương Thị Mỹ Hân, Nguyễn Văn Hòa, & Nguyễn Thị Ngọc Anh. (2016). Ảnh hưởng của hàm lượng Protein khác nhau trong thức ăn lên sinh trưởng và sinh sản của Artemia franciscana Vĩnh Châu. *Tạp chí Khoa học và Phát triển 2016*, 14, 1-9.
- Nguyễn Văn Hòa. (2005). Nâng cao hiệu quả việc nuôi sinh khối Artemia trên ruộng muối. *Báo cáo đề tài cấp bộ*. Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Cần Thơ.
- Nguyễn Văn Hòa, Đinh Kim Diệu, & Nguyễn Thị Ngọc Anh. (2014). Sử dụng bio-floc hình thành ở các độ mặn khác nhau làm thức ăn cho Artemia trong điều kiện phòng thí nghiệm. *Tạp chí Khoa học - Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ*, 34, 92-98.
- Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Thị Hồng Vân, Huỳnh Thanh Tới, & Trần Hữu Lễ. (2006). Nuôi tảo Chaetoceros sp. làm nguồn thức ăn cho hệ thống nuôi Artemia. *Tạp chí nghiên cứu khoa học*, 2006, 52-61.
- 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*. NXB Nông nghiệp.
- Huỳnh Thanh Tới, Nguyễn Thị Hồng Vân, Dương Thị Mỹ Hân, & Nguyễn Văn Hoà. (2006). Ảnh hưởng của tảo chaetoceros sp. lên chất lượng Artemia sinh khối. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học*, 2006, 62-73.
- Lê Trung Tâm. (2013). Ảnh hưởng của nồng độ muối và nhiệt độ lên các đặc điểm sinh trắc học sinh trưởng và sinh sản của các dòng Artemia franciscana (SFB). *Luận văn cao học*. Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.
- Ngô Thị Thu Thảo, & Vũ Đỗ Quỳnh. (1991). Ảnh hưởng của việc giảm các mức thức ăn đến tuổi thọ và sinh sản của Artemia Franciscana ở Vĩnh Châu. *Tuyển tập báo cáo khoa học hội nghị sinh học biển toàn quốc lần thứ I* (pp. 418-424). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Nguyễn Thị Hồng Vân, Dương Thị Mỹ Hân, & Nguyễn Văn Hòa. (2010). Ảnh hưởng của độ mặn lên sinh trưởng và sinh sản của hai dòng Artemia San Francisco Bay (SFB-VC) và Great Salt Lake (GSL). *Kỷ yếu Hội nghị khoa học thủy sản lần 4* (pp. 126-136). Đại học Cần Thơ.
- Vũ Ngọc Út, Tạ Văn Phương, & Nguyễn Thị Kim Liên. (2008). *Khảo sát thực trạng môi trường nước tại các vùng nuôi Artemia ở Vĩnh Châu, Sóc Trăng làm cơ sở cho việc phục hồi nghề nuôi tôm trong mùa mưa*. Dự án Cấp Bộ (GDI), Mã số: B2006-16-16.

### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Boyd, E. C. (1990). *Water Quality in Ponds for Aquaculture*. Birmingham, Alabama: Birmingham Publishing Company.
- Coutteau, P., & Sorgeloos, P. (1997). Manipulation of dietary lipids, fatty acids, and vitamins in zooplankton cultures. *Freshwater Biol.* 38,, 38, 501–512.
- Lavens, P., & Sorgeloss, P. (1996). *Manual on the Production and of live food for aquaculture*. University of Ghent Belgium, Published FAO: Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center.
- Lora-Vilchis, M. C., Cordero-Esquivel, B., & Voltolina-Lobina, D. (2004). Growth of Artemia franciscana fed with Isochrysis sp. and Chaetoceros muelleri during its early life stages. *Aquac. Res.*, 35, 1086–1091.

- Nguyen Thi Ngoc Anh. (2014). Effect of temperature on survival, growth and reproductive characteristics of *Artemia* (crustacea: Anostraca) from Vietnam and Iran. *International Journal of Artemia Biology*, 4(1), 3-17.
- Nguyen Van Hoa. (1993). Effect of Environment Conditions on the Quantitative Feed Requirements of the Brine Shrimp *A. franciscana* (Kellogg). *Msc Thesis*. University of Ghent.
- Shirota A. (1996). *The plankton of South Vietnam: Freshwater and marine planktons*. Technical Cooperation Agency, Japan.
- Sorgeloos, P. (1980). Life history of the brine shrimp *Artemia*. . *The brine shrimp Artemia, Proceeding of the International Symposium on the brine shrimp Artemia salina*. Corpus Chritis, Texas.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P., Tackaert, W., & Versichele, D. (1986). *Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture*. Ghent University, Ghent, Belgium.
- Van Stappen, & Gilbert. (1996). *Introduction: Biology and Ecology of Artemia*. FAO Fisheries Technical.
- Vanhaecke, P., & Sorgeloos, P. (1989). *The effect of temperature on cyst hatching larval survival and biomass production for different geographical strains of brine shrimp Artemia spp.* (Vol. 119). International study on *Artemia*. Ann. Soc. R. Zool. Bel.
- Wear, R. G., Haslett, S. J., & Alexander, N. K. (1986). Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* (Kellogg) from Lake Grassmere, New Zealand. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 98, 167–183.

## EFFECT OF ADDITIONALLY FORMULATED FEED AT DIFFERENT LEVELS COMBINATION WITH WILD ALGAE ON SURVIVAL RATE, GROWTH AND REPRODUCTION OF *ARTEMIA FRANCISCANA* VINH CHAU

Tran Huu Le, Pham Thi Ngoc Huyen, Nguyen Van Hoa  
Fishery Faculty, Can Tho University

Contact email: [thle@ctu.edu.vn](mailto:thle@ctu.edu.vn)

### ABSTRACT

The study was conducted to assess the effect of supplementation of formulated feed at different doses in combination with wild algae on survival, growth and reproductive performance of *Artemia franciscana* Vinh Chau. The experiment was setting up with 5 treatments. Treatment 1 (NT1): use 100% wild algae; Treatment 2 (NT2): wild algae + 10% formulated feed; Treatment 3 (NT3): wild algae + 20% formulated feed; Treatment 4: wild algae + 30% formulated feed; Treatment 5: wild algae + 40% formulated feeds. Wild algae were fed to *Artemia* daily at the rate of  $2 \times 10^6$  cells/mL. The study was conducted in laboratory condition with a density of 100 individuals per liter, using high saline water of 80 ‰. After 14 days of culture, the survival rate of all treatments was reached 81.5%, in which NT2 (wild algae + 10% formulated feed) had the highest survival rate ( $100 \pm 0.00\%$ ). However, the growth rate and reproductive parameters were showed highest in NT5 (wild algae + 40% formulted feed) and its difference statistically significant ( $p < 0.05$ ) as compared to other treatments.

**Key words:** *Artemia franciscana*, formulated feed, wild algae, growth rate and reproduction.

Received: 9<sup>th</sup> May 2018

Reviewed: 30<sup>th</sup> May 2018

Accepted: 5<sup>th</sup> June 2018