

# XÁC ĐỊNH MẬT ĐỘ NUÔI SINH KHỐI THÍCH HỢP VÀ ĐIỀU KIỆN THỨC ĂN TƯƠNG ỨNG CỦA TÔM TIÊN NƯỚC NGỌT, *Branchinella thailandensis*, LOÀI THỨC ĂN SỐNG TRIỂN VỌNG CHO ƯƠNG NUÔI THỦY SẢN Ở VIỆT NAM

Trần Thị Uyên Trang, Lê Mạnh Cường, Nguyễn Hoàng Minh\*

Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

\*Tác giả liên hệ: nhoangminh@hcmiu.edu.vn

Nhận bài: 24/05/2021 Hoàn thành phản biện: 05/09/2021 Chấp nhận bài: 06/09/2021

## TÓM TẮT

Tôm tiên nước ngọt, *Branchinella thailandensis*, là một loài giáp xác nước ngọt có triển vọng sử dụng làm thức ăn cho con giống ở giai đoạn ấu trùng tại Việt Nam vì chúng có kích thước nhỏ, khả năng phát triển nhanh và hàm lượng carotenoid cao. Trong nghiên cứu này, *B. thailandensis* được nghiên cứu để xác định lượng thức ăn và mật độ nuôi thích hợp để nuôi sinh khối trong môi trường nước ngọt. Để đạt được mục tiêu này, 01 thí nghiệm 3 nhân tố được thực hiện: (i) mật độ nuôi tôm tiên với 3 mức (250, 500 và 1000 cá thể/L); (ii) mật độ thức ăn (tảo sống *Spirulina platensis*) với 3 mức ( $5 \times 10^5$  tế bào/mL,  $1 \times 10^6$  tế bào/mL và  $2 \times 10^6$  tế bào/mL); và (iii) mật độ vi khuẩn có lợi *Bacillus subtilis* với 2 mức (0 và  $1 \times 10^3$  CFU/mL). Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 72 giờ, để đạt được tỷ lệ sống cao nhất ( $68.33\% \pm 10.4\%$ ) và chiều dài tối đa ( $2.32 \pm 0.23$  mm), cần áp dụng mật độ thức ăn là  $2 \times 10^6$  tế bào/mL với mật độ nuôi tối đa cần duy trì là 250 ấu trùng/L và có bổ sung vi khuẩn có lợi ( $1 \times 10^3$  CFU/mL). Ở điều kiện nuôi này, 01 thí nghiệm 02 nhân tố được thực hiện để khảo sát nồng độ Carotenoid và khả năng lưu trữ vi khuẩn có lợi trong cơ thể của tôm tiên nước ngọt *B. thailandensis*. Nhân tố mật độ vi khuẩn có lợi *B. subtilis* với 2 mức (0 và  $1 \times 10^3$  CFU/mL), nhân tố mật độ tảo với 3 mức:  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , và  $2 \times 10^6$  tế bào/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy *B. thailandensis* cũng có thể lưu giữ vi khuẩn có lợi trong cơ thể đến ít nhất là 48 giờ sau khi nở và đạt được hàm lượng carotenoid cao hơn hẳn lúc nuôi với nồng độ thức ăn thấp.

**Từ khóa:** *Branchinella thailandensis*, *Spirulina platensis*, Tôm tiên nước ngọt, Thức ăn sống

## IDENTIFYING THE SUITABLE STOCKING DENSITY AND FEED CONDITIONS FOR FRESHWATER FAIRY SHRIMP, *Branchinella thailandensis*, A POTENTIAL LIVE FEED SPECIES FOR LARVICULTURE IN VIET NAM

Tran Thi Uyen Trang, La Manh Cuong, Nguyen Hoang Minh\*

International University, Viet Nam National University – Ho Chi Minh city

### ABSTRACT

Freshwater fairy shrimp, *Branchinella thailandensis*, is a highly potential live feed for aquaculture species in Viet Nam, especially in their larval stages due to its small size, high growth and high carotenoid content. In this study, we aimed to identify the suitable feeding density and stocking density, which is inappropriate for mass production in freshwater. To attain these objectives, we conducted 01 three-factor experiment: (i) culture density with three levels (250, 500 and 1000 nauplii L<sup>-1</sup>); (ii) feed (live *Spirulina platensis*) concentration with three levels ( $5 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>,  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> and  $2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>); and (iii) beneficial bacteria *Bacillus subtilis* with two levels (0 and  $1 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>). The results indicated that after 72hrs, to the highest survival rate ( $68.33\% \pm 10.4\%$ ) and total length ( $2.32 \pm 0.23$  mm) were obtained when shrimps were fed live *S. platensis* at  $2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> with probiotics at  $1 \times 10^3$  CFU/mL, and density at 250 nauplii L<sup>-1</sup>. Under those culturing conditions, we conducted 01 two-factor experiment: feed (live *Spirulina platensis*) concentration with three levels ( $5 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>,  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> and  $2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>); and beneficial bacteria *Bacillus subtilis* with two levels (0 and  $1 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>). The results indicated that *B. thailandensis* could retain *B. subtilis* internally up to at least 48 hours and obtain significantly higher carotenoid content than at lower feed concentration.

**Keywords:** *Branchinella thailandensis*, Freshwater fairy shrimp, Live feeds, *Spirulina platensis*

## 1. MỞ ĐẦU

Ở nước ta, nuôi trồng thủy sản là một trong những ngành kinh tế mũi nhọn, mang lại thu nhập cao cho người nông dân. Trong quá trình nuôi thủy sản, việc chủ động được nguồn con giống chất lượng cao là một trong những yếu tố quyết định hiệu quả kinh tế của cả vụ (Phuong và cs., 2006). Mặc dù đã có một số nghiên cứu thử nghiệm cho con giống ăn thức ăn chế biến sẵn (Fernández-Díaz & Yúfera, 1997; Cahu & Infante, 2001), hiện tại vẫn chưa có một loại thức ăn chế biến nào có thể hoàn toàn thay thế thức ăn sống với chất lượng dinh dưỡng tương đương (Støttrup & McEvoy, 2003). Trong các loại thức ăn tươi sống, *Artemia* sp. được sử dụng rộng rãi nhất (Dhert & Sorgeloos, 1995) với sản lượng toàn cầu ước tính đạt 4000 tấn mỗi năm (Camara, 2020). Tuy nhiên, do *Artemia* sp. yêu cầu độ mặn tương đương với nước biển (35 ppt) nên chỉ nuôi được ở các vùng ven biển như Vĩnh Châu - Sóc Trăng, và Bạc Liêu. Ngoài ra, *Artemia* sp. không thể sống trong môi trường nước ngọt nên phần thức ăn không được tiêu thụ ngay sẽ chết và tích tụ trong bể nuôi. Điều này sẽ dẫn đến tích tụ chất độc, lây lan dịch bệnh và tăng tỷ lệ chết của các loài nuôi, đặc biệt là trong môi trường nuôi không được thay nước thường xuyên (Pratama và cs., 2020). Để giảm sự phụ thuộc vào *Artemia* sp. và tăng lợi ích từ việc sử dụng thức ăn tươi sống, đã có nhiều nghiên cứu đề xuất thay thế *Artemia* sp. bằng tôm tiên nước ngọt (freshwater fairy shrimp). Chúng là sinh vật bản địa, sinh sống trong các ao, hồ phù du ở khu vực châu Á (Velu & Munuswamy, 2003, 2007). Tôm tiên nước ngọt có khả năng thay thế *Artemia* sp. làm thức ăn cho con giống ở nước ngọt vì chúng sinh sản nhanh, dễ nở và không cần môi trường nước mặn/lợ nên khi cho con giống ăn, tôm tiên vẫn có thể sống và bơi lội trong nước nhờ đó giảm thiểu lượng thức ăn thừa trong bể nuôi. Nhiều nghiên cứu trên các loài tôm tiên nước ngọt khác

nhau đã khẳng định hiệu quả của chúng trong quá trình nuôi ấu trùng và con giống của nhiều loài vật nuôi như cá cảnh (Velu & Munuswamy, 2003, 2007; Salma và cs., 2013), và tôm càng xanh (Sriputhorn và Sanoamuang, 2011; Sornsupharp và cs., 2012). Mặc dù tôm tiên nước ngọt chỉ sinh sản theo mùa (chủ yếu là vào mùa mưa ở châu Á) nhưng trứng nghỉ (cyst) của chúng có thể bảo quản trong thời gian dài, trong điều kiện khô ráo mà không ảnh hưởng đến tỷ lệ nở (Dhert & Sorgeloos, 1995; Wallace, 2002; Dahms và cs., 2011). Thêm vào đó, ngoài dinh dưỡng của bản thân, tôm tiên nước ngọt có thể được sử dụng như vật dẫn trung gian để hỗ trợ sự hấp thụ gián tiếp men vi sinh của vật nuôi (Dhert & Sorgeloos, 1995; Hai và cs., 2010; Seenivasan và cs., 2012).

Ngoài các ưu thế kể trên, việc sử dụng tôm tiên trong quá trình nuôi thủy sản cũng hỗ trợ làm tăng hàm lượng carotenoid trong vật nuôi. Carotenoid có khả năng cải thiện tăng trưởng cũng như màu sắc và giá trị thương mại của tôm và cá (Sriputhorn & Sanoamuang, 2011). Vì cá và tôm không thể tự tổng hợp được carotenoid nên việc bổ sung carotenoid vào thức ăn là cần thiết (Dall, 1995). Vì vậy, tôm tiên nước ngọt là nguồn thay thế rất thích hợp cho *Artemia* sp. trong nuôi trồng thủy sản nước ngọt ở châu Á.

Tuy nhiên, sản lượng tôm tiên trên thế giới vẫn còn thấp. Một trong những giới hạn chính của sản xuất tôm tiên là nguồn giống. Hiện tại, vẫn chưa có một nghiên cứu nào được công bố về tôm tiên đặc hữu tại Việt Nam. Nguồn giống hiện tại phụ thuộc hoàn toàn vào nguồn cung nhập khẩu từ Thái Lan. Hơn thế nữa, sản lượng tôm tiên nước ngọt hiện tại vẫn rất thấp (50 cá thể/L) (Dararat và cs., 2012), chỉ bằng 0,02% của mật độ nuôi thương phẩm của *Artemia* sp. (250 cá thể/mL) (Hai và cs., 2010). Để tăng năng suất của tôm tiên nước ngọt, cần phải tăng mật độ nuôi lên trên mức hiện hữu nhưng vẫn phải đảm bảo các chỉ tiêu như tỷ

lệ sống, và chất lượng sản phẩm. Một trong những yếu tố cần thiết phải đánh giá là điều kiện thức ăn, và mật độ thức ăn như thế nào là phù hợp trong môi trường nuôi tôm tiên ở mật độ cao. Trong nghiên cứu này, tảo sống *Spirulina platensis*, vốn được đánh giá là vi tảo tốt nhất cho sự phát triển của động vật phù du (Chaoruangrit và cs., 2017) được sử dụng làm thức ăn cho tôm tiên nước ngọt, *Branchinella thailandensis*, loài tôm tiên có giá trị dinh dưỡng và khả năng phát triển nhanh nhất trong các loài đã được nghiên cứu (Dararat và cs., 2011; Dararat và cs., 2012). Ngoài ra, chúng tôi cũng đánh giá tác dụng của vi khuẩn có lợi *Bacillus subtilis*, một vi khuẩn hiếu khí, Gram dương, có hiệu quả cao trong việc tăng cường tỷ lệ sống và đã được áp dụng trong kỹ thuật giàu hóa tôm tiên nước ngọt (Purivirojkul, 2013).

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Nước nuôi

Nước nuôi được sử dụng là nước đã loại bỏ các ion, phân tử không mong muốn và có hại khỏi nước (RO) ở phòng Thí nghiệm thủy sinh, Đại học Quốc tế - Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

#### 2.1.2. Tôm tiên nước ngọt *Branchinella thailandensis*

Cysts (trứng nghi) *B. thailandensis* cysts được mua từ Thái Lan, vận chuyển về Đại học Quốc tế - Đại học quốc gia, thành phố Hồ Chí Minh và bảo quản ở điều kiện khô ráo, tránh ánh nắng trực tiếp. Cysts được sấy bằng đèn vàng 40W trong 6 - 8 tiếng. Cysts đã được sấy khô đặt vào túi vải nhỏ và ngâm với nước RO trong 8 tiếng. Cuối cùng, cysts được lấy ra khỏi túi và nuôi trong bể thủy tinh 1000 mL dưới ánh sáng trắng đèn LED 2000 lux (chu kỳ 12 - 12 sáng - tối), sục khí liên tục 24 giờ (nhiệt độ 24 - 29 °C, và pH 7,0 - 7,2). Nauplii được thu, đếm và chuyển sang các bể khác để tiến hành thí nghiệm.

#### 2.1.3. Tảo *Spirulina platensis*

Tảo có nguồn gốc từ Đại học Nha Trang và nuôi sinh khối ở phòng thí nghiệm thủy sinh (IU-VNU), trong nước RO, sử dụng môi trường Zarrouk (Zarrouk, 1966). Tảo được nuôi trong bình nhựa chiếu sáng theo chu kỳ 14 - 10 sáng - tối bằng đèn LED 2000 lux và sục khí liên tục (Kumari và cs., 2015).

#### 2.2.4. Vi khuẩn có lợi *Bacillus subtilis*

Trong thí nghiệm này, vi khuẩn có lợi *Bacillus subtilis* được cho trực tiếp vào các nghiệm thức nuôi tôm tiên nước ngọt. Vi khuẩn được mua từ Asia Green Technology Ltd dưới dạng viên nén bột, sau đó cấy lên đĩa thạch và nuôi tăng sinh trong môi trường Lysogeny Broth (LB) và trữ ở tủ âm vi sinh ở 30°C trong 24 giờ trước khi sử dụng (La, 2020).

## 2.2. Bố trí thí nghiệm

*Thí nghiệm 1:* Khảo sát mật độ nuôi thích hợp cho tỷ lệ sống và sự sinh trưởng của tôm tiên nước ngọt *B. thailandensis* trong điều kiện có hoặc không có bổ sung vi khuẩn có lợi *B. subtilis* và mật độ thức ăn tảo khác nhau

Thí nghiệm gồm 3 nhân tố: (i) mật độ nuôi tôm tiên với 3 mức: 250, 500 và 1000 cá thể/L; (ii) mật độ thức ăn (tảo sống *Spirulina platensis*) với 3 mức:  $5 \times 10^5$  tế bào/mL,  $1 \times 10^6$  tế bào/mL và  $2 \times 10^6$  tế bào/mL (Chaoruangrit và cs., 2017); và (iii) mật độ vi khuẩn có lợi *Bacillus subtilis* với 2 mức: 0 và  $1 \times 10^3$  CFU/ mL (Purivirojkul, 2013; La, 2020). Tổng số kết hợp giữa các nghiệm thức của 3 nhân tố là 18. Mỗi sự kết hợp giữa các nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Như vậy, tổng số đơn vị thí nghiệm là 54.

Mỗi đơn vị thí nghiệm là 1 cốc thủy tinh có thể tích 1 L. Tôm tiên trong mỗi cốc được cho ăn hai lần mỗi ngày lúc 9:00 sáng và 5:00 chiều. Ở các mốc 24, 48, 72, và 96 giờ, năm cá thể tôm tiên được thu ngẫu nhiên từ mỗi cốc để đánh giá quá trình tăng trưởng của tôm trong mỗi nghiệm thức. Thí

nghiệm kết thúc khi tỷ lệ sống ở tất cả các cốc giảm xuống dưới 50%.

**Thí nghiệm 2:** Khảo sát nồng độ Carotenoid và khả năng lưu trữ vi khuẩn có lợi trong cơ thể của tôm tiên nước ngọt *Branchinella thailandensis*

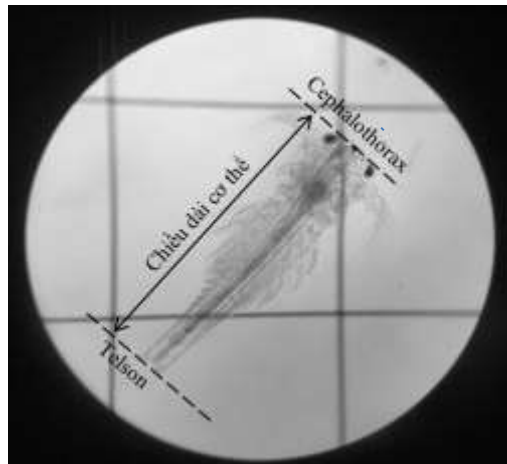
Từ kết quả của thí nghiệm 1, nghiệm thức mật độ có tôm tiên sự tăng trưởng và tỷ lệ sống tốt nhất được dùng để tiếp tục tiến hành thí nghiệm 2.

Đối tượng nuôi trong thí nghiệm này bị ảnh hưởng bởi 2 nhân tố: mật độ vi khuẩn với 2 mức: 0 và  $1 \times 10^3$  CFU/mL; và mật độ thức ăn với 3 mức:  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , và  $2 \times 10^6$  tế bào/mL. Mỗi sự kết hợp của các nghiệm thức được lặp lại ba lần và tổng số

đơn vị thí nghiệm là 18. Các điều kiện nuôi khác được giữ nguyên theo như thiết kế của nghiệm thức được chọn từ thí nghiệm 1. Tôm tiên trong mỗi cốc thủy tinh 1 L được cho ăn 2 lần mỗi ngày vào lúc 9:00 sáng và 5:00 chiều. Sau 48 giờ, kể từ khi ấp nở, khoảng thời gian tối đa được ghi nhận trong thí nghiệm làm giàu nhuyễn thể (Stappen, 1996), tất cả các cá thể tôm tiên ở mỗi nghiệm thức được thu hoạch để phân tích khả năng lưu trữ vi khuẩn có lợi và nồng độ carotenoid trong cơ thể.

### 2.3. Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp xác định

#### 2.3.1. Tăng trưởng



**Hình 1.** *Branchinella thailandensis* sau 48 giờ. Chiều dài cơ thể tính từ phần đầu ngực (cephalothorax) đến đốt cuối bụng (telson) trong buồng đếm Sedgewick-Rafter (mỗi cạnh ô vuông có chiều dài 1 mm).

Tăng trưởng của *B. thailandensis* được đánh giá qua tiêu chí độ dài cơ thể của tôm tiên, xác định bằng cách đo chiều dài từ phần đầu ngực (cephalothorax) đến đốt cuối bụng (telson) (Hình 1) của năm cá thể ngẫu nhiên từ mỗi cốc. Các cá thể nuôi được đo dưới kính hiển vi quang học khi sử dụng buồng đếm Sedgewick-Rafter. Quá trình đo tiến hành song song với quá trình tính tỷ lệ sống.

#### 2.3.2. Tỷ lệ sống

Tỷ lệ sống được xác định bằng cách thu mẫu với thể tích 1 ml ở 3 vị trí khác nhau trong cùng 1 bể nuôi và đếm tất cả số các thể có thể thấy được trong buồng đếm Sedgewick-Rafter dưới kính hiển vi quang học. Giá trị trung bình của 3 mẫu đã thu sau đó được dùng để tính ra số lượng cá thể trong bể nuôi đó dựa vào quy tắc tam suất. Tỷ lệ sống được theo dõi mỗi ngày sử dụng công thức sau:

$$SR = \frac{Nf}{Ni} \times 100$$

Trong đó, SR: tỷ lệ sống, Ni: số lượng cá thể lúc bắt đầu thí nghiệm, Nf: số lượng cá thể lúc đếm

### 2.3.3. Mật độ vi khuẩn để khảo sát khả năng trừ vi khuẩn có lợi trong cơ thể tôm tiên

150 cá thể tôm ở mỗi cốc sau khi thu hoạch được rửa sạch bằng nước cất (2 lần), benzalkonium chloride nồng độ 0,1%, và sau đó rửa sạch lại bằng nước cất (lần thứ ba) để loại bỏ tạp chất và vi khuẩn khác bám trên bề mặt cơ thể. Mẫu đã làm sạch được nghiền nhỏ và pha loãng với nước muối sinh lý 0,9%. 1ml của dung dịch này được trải trên đĩa thạch LB (pH = 7, 0 - 7,2) rồi đếm số vi khuẩn lạc có thể nhìn thấy được (Hai và cs., 2010). Lượng vi khuẩn ở mỗi mL của dung dịch ban đầu của mỗi cốc được xác định theo công thức (TCVN, 2021):

$$CFU/mL = \frac{C}{d \times V}$$

Trong đó, C là số vi khuẩn lạc trung bình tính trên 3 đĩa, V là thể tích chủng thêm vào mỗi đĩa petri (1 mL), d là hệ số pha loãng của dung dịch được đếm.

Kết quả thu được được chia cho số lượng cá thể sử dụng trong mỗi cốc để ra kết quả CFU/cá thể, tương tự như cách trình bày kết quả của Hai và cs. (2010).

### 2.3.4. Nồng độ carotenoid

Mẫu tôm sau khi thu hoạch được nghiền nhỏ trong bằng dung dịch 95% Ethanol và mang đi ly tâm ở 1.000 vòng/phút trong 15 phút. Phần nổi phía trên

được tách ra và 0,5 ml của phần này được trộn với 4,5 ml dung dịch tương ứng. Các mẫu được đo bằng máy quang phổ, nồng độ carotenoid của các nghiệm thức được tính theo công thức sau (Sumanta và cs., 2014):

$$Ch_{-a} = 13,36A_{664} - 5,19A_{649}$$

$$Ch_{-b} = 27,43A_{649} - 8,12A_{664}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 2,13Ch_{-a} - 97,63Ch_{-b}}{209}$$

Trong đó, A = Absorbance, Ch<sub>-a</sub> = Chlorophyll-a, Ch<sub>-b</sub> = Chlorophyll-b, C<sub>x+c</sub> = Carotenoids

## 2.4. Xử lý số liệu

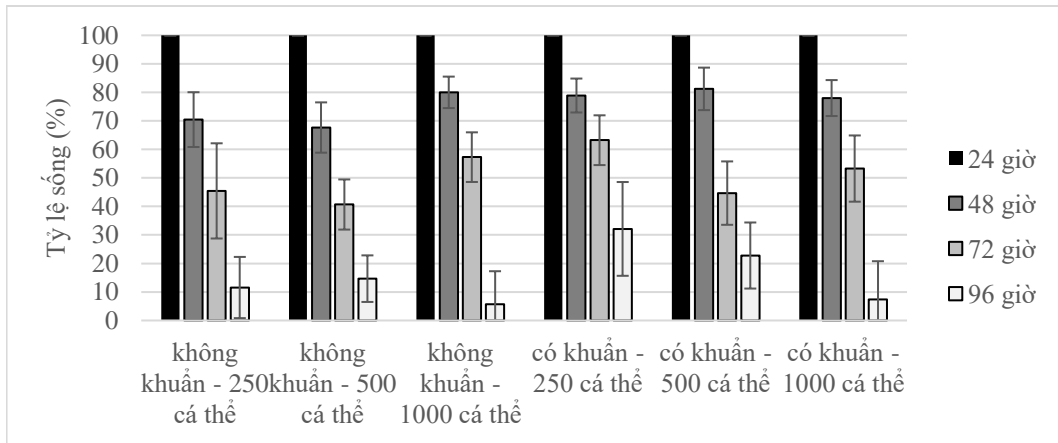
Phần mềm Excel 2017 được sử dụng để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và vẽ biểu đồ. Sử dụng ANOVA 3 nhân tố ( $\alpha = 0,05$ ) để phân tích ảnh hưởng của các nhân tố thí nghiệm. Sự khác biệt giữa các trung bình nghiệm thức được kiểm tra bằng phép thử Tukey' test ( $\alpha = 0,05$ ) bằng phần mềm Minitab 19.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Thí nghiệm 1

#### 3.1.1. Tỷ lệ sống

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Hình 2 cho thấy, sau 48 giờ kể từ khi trứng nở, tỷ lệ sống ở các nghiệm thức trung bình là 75%. Thí nghiệm kết thúc sau 96 giờ khi tất cả các nghiệm thức đều có tỷ lệ sống dưới 50%. Tỷ lệ này gần giống với tỷ lệ sống của *Artemia* (78%) ở cùng thời gian (Hai và cs., 2010) nhưng giảm đáng kể sau 72 giờ.



**Hình 2.** Tỷ lệ sống của tôm tiên nước ngọt *Branchinella thailandensis* trong điều kiện có hoặc không bổ sung vi khuẩn ở các mật độ 250, 500 và 1000 cá thể/L.

Kết quả thống kê ANOVA 3 nhân tố (Bảng 1) cho thấy, tỷ lệ sống của tôm tiên nước ngọt trong các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn (có vi khuẩn:  $53,72\% \pm 13,25$ ; không vi khuẩn:  $47,80\% \pm 14,14$ ). Tỷ lệ sống giữa các mật độ nuôi 250, 500, và 1000 cá thể/L (tương ứng với  $54,33\% \pm 16,47$ ,  $42,67\% \pm 15,78$  và  $55,28\% \pm 10,76$ ) cũng có khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Tuy nhiên, kết quả phân tích sâu (Tukey’s test) cho thấy, việc bổ sung vi khuẩn làm tăng tỷ lệ sống của tôm tiên nước ngọt nhưng bị giới hạn ở mật độ nuôi. Để có được kết quả tốt nhất, ta cần duy trì việc bổ sung vi khuẩn có lợi và kiểm soát mật độ nuôi ở mức 250 cá thể/L (Bảng 2). Mật độ nuôi ở thí nghiệm này thấp hơn rất nhiều so với mật độ nuôi của *Artemia* sp. là 250 cá thể/mL (Hai và cs., 2010) nhưng cao gấp 5 lần so với các thí nghiệm khác trên tôm tiên nước ngọt *B. thailandensis* 10 cá thể/L (Saengphan và Sanoamuang, 2009).

**Bảng 1.** Kết quả thống kê ANOVA 3 nhân tố ( $\alpha = 0,05$ ) về tỷ lệ sống khi nuôi tôm tiên nước ngọt *Branchinella thailandensis* ở các mật độ nuôi và mật độ thức ăn tảo (*Spirulina platensis*) khác nhau, trong điều kiện có hoặc không bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Nhân tố	p
Vi khuẩn (A)	0,014
Mật độ tảo (B)	0,194
Mật độ nuôi (C)	0,004
A × B	0,434
A × C	0,024
B × C	0,754
A × B × C	0,091

**Bảng 2.** Tỷ lệ sống (%) của tôm tiên nước ngọt *Branchinella thailandensis* sau 72 giờ ở các mật độ nuôi và mật độ tảo *Spirulina platensis* khác nhau trong điều kiện có hoặc không có bổ sung khuẩn *Bacillus subtilis*.

Mật độ nuôi ( cá thể/L)	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	Mật độ tảo (tế bào/mL)		
		$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^6$
250	0	$37,333 \pm 11,676^1$	$61 \pm 11,533$	$38 \pm 20,952$
500		$33,333 \pm 4,163$	$41,333 \pm 9,238$	$47,333 \pm 9,866$
1000		$59 \pm 7$	$57,167 \pm 9,005$	$55,667 \pm 14,224$
250	$1 \times 10^3$	$62 \pm 9,165$	$59,333 \pm 9,292$	$68,333 \pm 10,408$
500		$41,333 \pm 15,011$	$46 \pm 14,422$	$46,667 \pm 9,866$
1000		$46,833 \pm 9,518$	$51 \pm 9,539$	$62 \pm 15,524$

<sup>1</sup>Độ lệch tiêu chuẩn

### 3.1.2. Tăng trưởng

Kết quả thống kê ANOVA 3 nhân tố (Bảng 3) cho thấy, sự phát triển của *B. thailandensis* chịu ảnh hưởng mật độ nuôi, thức ăn tảo và điều kiện nuôi có vi khuẩn có lợi hay không. Tuy nhiên, tác dụng của việc bổ sung vi khuẩn có lợi vào môi trường nuôi bị chi phối bởi điều kiện mật độ nuôi và mật độ thức ăn. Khi mật độ nuôi ở mức thấp (250 cá thể/L), trong điều kiện không có *B. subtilis*, tốc độ tăng trưởng của *B. thailandensis* tăng khi lượng thức ăn ở mức  $1 \times 10^6$  tế bào/mL trở lên. Tuy nhiên, trong điều kiện có bổ sung vi khuẩn có lợi, *B. thailandensis* ở mật độ nuôi 250 cá thể/L có thể đạt được kết quả tăng trưởng tương tự (Tukey's test,  $p < 0,05$ ) như vậy ngay cả khi lượng thức ăn ở dưới mức  $1 \times 10^6$  tế bào/mL (Bảng 4). Khi mật độ nuôi từ 500 cá thể/L trở lên, tác dụng của việc bổ sung vi khuẩn có lợi và tăng thức ăn đã không được duy trì và *B. thailandensis* tăng trưởng chậm rõ rệt khi so sánh với mật độ nuôi 250 cá thể/mL (Tukey's test,  $p < 0,05$ , Bảng 4).

Khi mật độ nuôi tăng, nhu cầu tiêu thụ thức ăn để đảm bảo đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của vật nuôi cũng tăng theo. Nếu mật độ thức ăn quá thấp, quá trình phát triển của

tôm tiên sẽ bị chậm lại, dẫn đến thời gian nuôi kéo dài và giảm sản lượng thu hoạch (Namin và cs., 2007). Kết quả thí nghiệm đã chỉ rõ rằng với mật độ nuôi tăng như thiết kế thì mật độ thức ăn tối thiểu phải ở mức  $1 \times 10^6$  tế bào/mL để đạt được hiệu quả nuôi cao. Tuy nhiên, khi mật độ thức ăn tăng cao, tốc độ tiêu thụ thức ăn của tôm tiên bị suy giảm và tôm tiên cần nhiều thời gian hơn để sử dụng hết lượng tảo được cung cấp (Brendonck, 1993). Lượng thức ăn còn thừa trong nước không được tiêu thụ kịp thời có thể gây ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường nước và sự phát triển của tôm tiên (Yamasaki-Granados và cs., 2013). Ngoài ra, khi mật độ nuôi tăng cao, ngay cả khi mật độ thức ăn là phù hợp, tôm tiên dễ nhiễm bệnh hơn, phát triển hành vi ăn thịt đồng loại và làm suy giảm chất lượng nước (Nhan và cs., 2010; Gao và cs., 2017; Liu và cs., 2017; Pormehr Yabandeh và cs., 2017). Tuy nhiên, các vấn đề này có thể được hỗ trợ giảm thiểu nếu trong môi trường nuôi có sự hiện diện của vi khuẩn có lợi (Hai, 2015). Hơn thế nữa, vi khuẩn có lợi cũng hỗ trợ việc tiêu hóa thức ăn ở vật nuôi, đặc biệt là đối với thức ăn có kích thước lớn như *S. platensis* (Hai, 2015).

**Bảng 3.** Kết quả thống kê ANOVA 3 nhân tố ( $\alpha = 0,05$ ) về tăng trưởng của tôm tiên nước ngọt *Branchinella thailandensis* ở các mật độ nuôi và mật độ thức ăn tảo (*Spirulina platensis*) khác nhau trong điều kiện có hoặc không bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Nhân tố	p
Vi khuẩn (A)	$5,351 \times 10^{-4}$
Mật độ tảo (B)	$2,344 \times 10^{-5}$
Mật độ nuôi (C)	$3,386 \times 10^{-22}$
A × B	0,501
A × C	0,083
B × C	0,019
A × B × C	$4,451 \times 10^{-4}$

**Bảng 4.** Tăng trưởng (mm) của tôm tiên nước ngọt *Branchinella thailandensis* sau 72 giờ ở các mật độ nuôi và mật độ tảo *Spirulina platensis* khác nhau trong điều kiện có hoặc không có bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Mật độ nuôi (cá thể/L)	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	Mật độ tảo (tế bào/mL)		
		$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^6$
250	0	$1,87 \pm 0,04^{bc1}$	$2,47 \pm 0,22^a$	$2,69 \pm 0,25^a$
500		$1,35 \pm 0,01^{def}$	$1,45 \pm 0,04^{cdef}$	$1,39 \pm 0,01^{cdef}$
1000		$1,05 \pm 0,18^f$	$1,03 \pm 0,05^f$	$1,10 \pm 0,11^f$
250	$1 \times 10^3$	$2,35 \pm 0,21^{ab}$	$2,32 \pm 0,23^{ab}$	$2,43 \pm 0,23^a$
500		$1,43 \pm 0,05^{cdef}$	$1,77 \pm 0,20^{cd}$	$1,66 \pm 0,09^{cd}$
1000		$1,14 \pm 0,03^{ef}$	$1,13 \pm 0,02^f$	$1,63 \pm 0,30^{cde}$

a, b, c, d, e, f: Các chữ cái khác nhau trong bảng biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha=0,05$ .

<sup>1</sup>Độ lệch tiêu chuẩn

**3.2. Thí nghiệm 2**

**3.2.1. Khả năng lưu trữ vi khuẩn có lợi**

Kết quả Bảng 5 cho thấy, lượng lợi khuẩn được giữ lại tăng khi lượng thức ăn tăng lên và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa mật độ thức ăn  $5 \times 10^5$  tế bào/mL và  $2 \times 10^6$  tế bào/mL. Một điểm đáng chú ý ở đây là số lượng vi khuẩn có lợi được giữ lại không có sự khác biệt khi mật độ thức ăn tăng từ  $1 \times 10^6$  tế bào/mL lên  $2 \times 10^6$  tế bào/mL. Kết quả của nhóm nghiên cứu thấp hơn rất nhiều khi so sánh với kết quả thí nghiệm của Hai và cs. (2010) trên *Artemia* sp. ( $3 \times 10^4$  CFU/cá thể). Tuy nhiên, thí nghiệm này sử dụng hỗn hợp hai vi khuẩn có lợi *Pseudomonas synxantha* và *P. aeruginosa* ở mật độ  $10^5$  CFU/mL, gấp 100 lần lượng khuẩn mà chúng tôi sử dụng.

Kết quả này khẳng định khả năng lưu giữ vi khuẩn có lợi *B. subtilis* trong cơ thể tôm tiên nước ngọt, *B. thailandensis*, đến ít nhất là 48 giờ sau khi nở, trong điều kiện thức ăn dồi dào. Nhiều nghiên cứu chỉ làm giàu *Artemia* spp. bằng *Bacillus* spp. trong vòng 8 đến 24 giờ sau khi nở (Ziaei-Nejad và cs., 2005; Arndt và Wagner, 2007; Daniels và cs., 2010; Jamali và cs., 2015), nhưng nghiên cứu của Purivirojkul (2013)

đã chỉ ra là mật độ vi khuẩn có lợi cao nhất 48 giờ sau khi bắt đầu thí nghiệm. Hơn thế nữa, sự phát triển của khuẩn lạc *B. subtilis* trên đĩa thạch sau khi kết thúc thí nghiệm 2 chứng minh là các vi khuẩn có lợi, sau khi được hấp thụ vào cơ thể *B. thailandensis* vẫn có thể hoạt động bình thường. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã xác định, vi khuẩn có lợi sau khi được đưa vào cơ thể vật nuôi thông qua động vật ăn lọc thụ động như *Artemia* spp. hay tôm tiên nước ngọt đã được làm giàu vẫn có thể phát triển mạnh mẽ và hỗ trợ cho sự phát triển của vật nuôi một cách hiệu quả (Ziaei-Nejad và cs., 2005; Daniels và cs., 2010). Việc nồng độ vi khuẩn có lợi không tăng đáng kể (Bảng 5) khi mật độ thức ăn tăng gấp đôi (từ  $1 \times 10^6$  tế bào/mL lên  $2 \times 10^6$  tế bào/mL) có thể được giải thích rằng mật độ thức ăn  $2 \times 10^6$  tế bào/mL có thể đã vượt ngưỡng tiêu thụ (ingestion rate) của *B. thailandensis*. Trong trường hợp này, dù tôm tiên được cho ăn nhiều tảo *S. platensis* hơn, vật nuôi cũng không thể tăng khả năng tiêu thụ thức ăn (Houde và Roman, 1987; Muller-Feuga và cs., 2003) và do đó, cũng không thể hấp thụ thêm lượng vi khuẩn có lợi có trong thức ăn.

**Bảng 5.** Mật độ vi khuẩn (trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn) (CFU/cá thể) lưu giữ trong cơ thể tôm tiên *Branchinella thailandensis* ở các nghiệm thức mật độ thức ăn tảo *Spirulina platensis* khác nhau trong điều kiện có bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Mật độ tảo (tế bào/mL)	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^6$
Mật độ vi khuẩn (CFU/cá thể)	$0,15 \pm 0,03^1 \times 10^{3b}$	$0,22 \pm 0,01 \times 10^{3ab}$	$0,24 \pm 0,04 \times 10^{3a}$

a, b: Các chữ cái khác nhau trong bảng biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha=0,05$ .

<sup>1</sup>Độ lệch tiêu chuẩn



### 3.2.2. Nồng độ carotenoid

Kết quả Bảng 6 cho thấy, nồng độ carotenoid không thể xác định ở mật độ tảo thấp nhất  $5 \times 10^5$  (tế bào/mL). Ở nghiệm thức có mật độ tảo  $1 \times 10^6$  và  $2 \times 10^6$  (tế bào/mL), nồng độ carotenoid là như nhau (khác biệt không có ý nghĩa thống kê, Tukey's test,  $p > 0,05$ ). Một thí nghiệm của Chaoruangrit và cs. (2017) về nồng độ carotenoid ở các loại thức ăn khác nhau trên tôm tiên nước ngọt cho kết quả nồng độ carotenoid của bột tảo *S. platensis* là  $0,064 \pm 0,01$  mg/g, cao hơn so với khi sử dụng tảo *S. platensis* tươi. Tuy nhiên, thí nghiệm này được thực hiện

**Bảng 6.** Nồng độ Carotenoid (trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn) ( $\mu$ g/g mẫu vật tươi) của tôm tiên *Branchinella thailandensis* ở các nghiệm thức mật độ thức ăn tảo *Spirulina platensis* khác nhau trong điều kiện có bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Mật độ tảo (tế bào/mL)	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^6$
Nồng độ Carotenoid ( $\mu$ g/g mẫu vật tươi)	Không xác định	$0.82 \pm 1.03^{a1}$	$0.94 \pm 0.56^a$

<sup>1</sup>Độ lệch tiêu chuẩn

## 4. KẾT LUẬN

Tôm tiên nước ngọt *Branchinella thailandensis* là loài sinh vật bản địa có khả năng hỗ trợ thay thế *Artemia* sp. trong quá trình sản xuất thức ăn sống cho vật nuôi trong giai đoạn sản xuất ấu trùng và con giống. Để đạt được kết quả tăng trưởng và tỷ lệ sống tốt nhất, mật độ nuôi của *B. thailandensis* cần được duy trì ở mức không quá 250 cá thể/L trong điều kiện có bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* ở nồng độ  $10^3$  CFU/mL và cho ăn tảo *Spirulina platensis* tươi từ  $1 \times 10^6$  (tế bào/mL) trở lên. Mật độ nuôi và lượng thức ăn như trên cũng hỗ trợ khả năng lưu trữ vi khuẩn có lợi và hàm lượng carotenoid cao nhất, thích hợp cho kỹ thuật tạo vật dẫn trung gian trong sản xuất thủy sản tại Việt Nam.

## LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn các thành viên của Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc tế - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện và hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này. Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế - ĐHQG-HCM tài trợ trong đề tài có mã số T2019-03-BT.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### 1. Tài liệu tiếng Việt

trên cá thể *B. thailandensis* 20 ngày tuổi, với kích thước tối đa là  $22,62 \pm 0,51$  mm, gấp nhiều lần so với cá thể tôm tiên sử dụng trong bài viết này (tối đa 96 giờ tuổi và  $2,69 \pm 0,25$  mm chiều dài). Nhiều khả năng hàm lượng carotenoid từ *B. thailandensis* 48 giờ tuổi không tạo được sự khác biệt lên hàm lượng carotenoid của con giống thủy sản. Tuy nhiên, kết luận này phải được kiểm chứng bởi các nghiên cứu đo đạc sự hấp thụ và tích trữ carotenoid của con giống thủy sản khi được cho ăn *B. thailandensis* ở các độ tuổi khác nhau.

Tiêu chuẩn Việt Nam. (2021). *TCVN đánh giá hiệu quả kháng vi sinh vật của sản phẩm mỹ phẩm*. Thành phố Hồ Chí Minh: Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học & Công nghệ.

### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Arndt, R. E., & Wagner, E. J. (2007). Enriched *Artemia* and Probiotic Diets Improve Survival of Colorado River Cutthroat Trout Larvae and Fry. *North American Journal of Aquaculture*, 69, 190 - 196.
- Brendonck, L. (1993). Feeding in the fairy shrimp *Streptocephalus proboscideus* (Frauenfeld) (Branchiopoda: Anostraca). II. Influence of environmental conditions on feeding rate. *Journal of crustacean biology*, 13(2), 245 - 255.
- Cahu, C., & Infante, J. Z. (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae *Aquaculture*, 200(1 - 2), 161 - 180.
- Camara, M. R. (2020). After the gold rush: A review of *Artemia* cyst production in northeastern Brazil. *Aquaculture Reports*, 17.
- Chaoruangrit, L., Tapaneeyaworawong, P., Powtongsook, S., & Sanoamuang, L.-o. (2017). Alternative microalgal diets for cultivation of the fairy shrimp *Branchinella thailandensis* (Branchiopoda: Anostraca). *Aquaculture international*, 26(1), 37-47.

- Dahms, H. U., Hagiwara, A., & Lee, J.-S. (2011). Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquatic Toxicology*, 101, 1 - 12.
- Dall, W. (1995). Carotenoids versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). *Marine Biology*, 124(2), 209 - 213.
- Daniels, C. L., Merrifield, D. L., Boothroyd, D. P., Davies, S. J., Factor, J. R., & Arnold, K. E. (2010). Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture*, 304, 49 - 57.
- Dararat, W., Lomthaisong, K., & Sanoamuang, L.-o. (2012). Biochemical composition of three species of fairy shrimp (Branchiopoda: Anostraca) from Thailand. *Journal of crustacean biology*, 32, 81 - 87.
- Dararat, W., Starkweather, P. L., & Sanoamuang, L.-o. (2011). Life history of three fairy shrimps (Branchiopoda: Anostraca) from Thailand. *Journal of crustacean biology*, 31, 623 - 629.
- Dhert, P., & Sorgeloos, P. (1995). Live feeds in aquaculture. *Infofish International*, 2, 31-39.
- Fernández-Díaz, C., & Yúfera, M. (1997). Detecting growth in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed microcapsules. *Aquaculture*, 153, 93 - 102.
- Gao, Y., He, Z., Vector, H., Zhao, B., Li, Z., He, J., . . . Chu, Z. (2017). Effect of Stocking Density on Growth, Oxidative Stress and HSP 70 of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 877 - 884.
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 917 - 935.
- Hai, N. V., Buller, N., & Fotedar, R. (2010). Encapsulation capacity of *Artemia* nauplii with customized probiotics for use in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Research*, 41, 893 - 903.
- Houde, S. E. L., & Roman, M. R. (1987). Effects of food quality on the functional ingestion response of the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 40, 69 - 77.
- Jamali, H., Imani, A., Abdollahi, D., Roozbehfar, R., & Isari, A. (2015). Use of Probiotic *Bacillus* spp. in Rotifer (*Brachionus plicatilis*) and Artemia (*Artemia urmiana*) Enrichment: Effects on Growth and Survival of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Larvae. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(2), 118 - 125.
- Kumari, A., Pathak, A. K., & Guria, C. (2015). Cost-effective cultivation of *Spirulina platensis* using NPK fertilizer. *Agricultural Research*, 4, 261–271.
- La, C. M. (2020). Study on the optimal feeds for gut loading techniques on freshwater fairy shrimp, *Branchinella thailandensis*. (Bachelor thesis), International University, Viet Nam National University (IU – VNU), Ho Chi Minh city, Viet Nam.
- Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X., & Ye, Z. (2017). Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 19 - 26.
- Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., & Divanach, P. (2003). Uses of Microalgae in Aquaculture. In J. G. Støttrup & L. A. McEvoy (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Bodmin, Cornwall: Blackwell Science.
- Namin, I., Arshad, J. U., & Ramezani, Z. (2007). Mass culture of fairy shrimp *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea – Anostraca) and its use in larviculture of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research*, 38, 1088-1092.
- Nhan, D. T., Wille, M., Hung, L. T., & Sorgeloos, P. (2010). Effects of larval stocking density and feeding regime on larval rearing of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*, 300(1 - 4), 80 - 86.
- Puong, N. T., Hai, T. N., Hien, T. T. T., Bui, T. V., Son, V. N., Morooka, Y., . . . Wilder, M. N. (2006). Current status of freshwater prawn culture in Vietnam and the development and transfer of seed production technology. *Fisheries Science*, 72(1), 1 - 12.
- Pormehr Yabandeh, N., Beladjal, L., Agh, N., Atashbar, B., & Stappen, G. V. (2017). Mass culture of fairy shrimp *Branchinecta orientalis* (G. O. Sars 1901) (Crustacea: Anostraca) using effluent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792)

- ponds. *Aquaculture Research*, 48(11), 5455 - 5462.
- Pratama, I., Albasri, H., & Abinawanto. (2020). Potential development of fairy shrimp *Streptocephalus* spp. as aquaculture live feed in Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 521(1), dah012026.
- Purivirojkul, W. (2013). Application of Probiotic Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria in Fairy Shrimp *Branchinella thailandensis* culture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13, 187 - 196.
- Saengphan, N., & Sanoamuang, L.-o. (2009). Effect of Food Concentrations on Growth and Survival of the Fairy Shrimp *Branchinella thailandensis* Sanoamuang, Saengphan and Murugan. *Burapha Science Journal*, 14, 19-28.
- Salma, D., Davoodi, R., Shamsaei, M., & Kamali, A. (2013). Comparative Effect of Fairy Shrimp and Artemia in the Rearing of Blue Gourami, *Trichogaster trichopterus*, Larvae. *Annual Review & Research in Biology*, 3(2), 70 - 75.
- Seenivasan, C., Bhavan, P. S., Radhakrishnan, S., & Shanthi, R. (2012). Enrichment of *Artemia* nauplii with *Lactobacillus sporogenes* for Enhancing the Survival, Growth and Levels of Biochemical Constituents in the Post-Larvae of the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 23 - 31.
- Sornsupharph, S., Dahms, H. U., & Sanoamuang, L. (2012). Nutrient composition of fairy shrimp *Streptocephalus sirindhornae* nauplii as live food and growth performance of giant freshwater prawn postlarvae. *Aquaculture nutrition*, 19(3), 349-359.
- Sriputhorn, K., & Sanoamuang, L. (2011). Fairy shrimp (*Streptocephalus sirindhornae*) as live feed improve growth and carotenoid contents of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *International Journal of Zoological Research*, 7(2), 138 - 146.
- Stappen, G. V. (1996). Artemia. In P. Lavens & P. Sorgeloos (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture* FAO Fisheries Technical Paper (Vol. 361). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Støttrup, J. G., & McEvoy, L. A. (Eds.). (2003). *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Bodmin, Cornwall: Blackwell Science.
- Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4, 63-69.
- Velu, C. S., & Munuswamy, N. (2003). Nutritional evaluation of decapsulated cysts of fairy shrimp (*Streptocephalus dichotomus*) for ornamental fish larval rearing. *Aquaculture Research*, 34, 967 - 974.
- Velu, C. S., & Munuswamy, N. (2007). Composition and nutritional efficacy of adult fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* as live feed. *Food Chemistry*, 100, 1435 - 1442.
- Wallace, R. L. (2002). Rotifers: exquisite metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 660 - 667.
- Yamasaki-Granados, S., García-Guerrero, M., Vega-Villasante, F., Castellanos-León, F., Cavalli, R. O., & Cortés-Jacinto, E. (2013). Experimental culture of the river prawn *Macrobrachium americanum* larvae (Bate, 1868), with emphasis on feeding and stocking density effect on survival. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4), 793 - 800.
- Zarrouk, C. (1966). *Contribution à l'étude cyanophycée : influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima*, Setch et Gardner Geitler. (PhD. Thesis), University of Paris, Paris. Available from <http://worldcat.org/z-wcorg/database>.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A.-R., & Shakouri, M. (2005). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252(2 - 4), 516 - 524.