

# ẢNH HƯỞNG CỦA ASTAXANTHIN BỔ SUNG VÀO THỨC ĂN LÊN SỰ TÍCH LŨY SẮC TỐ TRONG CƠ-DA, KHẢ NĂNG CHỊU SỐC ĐỘ MUỐI VÀ KHÁNG LẠI ĐỘC TỐ ĐỒNG CỦA CÁ KHOANG CỔ NEMO, *Amphiprion ocellaris* THƯƠNG MẠI

Hồ Sơn Lâm\*, Phan Thị Ngọc

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

\*E-mail: hslamqt@gmail.com

Ngày nhận bài: 25-11-2016 / Ngày chấp nhận đăng: 27-1-2017

**TÓM TẮT:** Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của Astaxanthin bổ sung vào thức ăn lên sự tích lũy sắc tố này trong cơ-da cũng như khả năng chịu sốc độ muối và kháng lại độc tố đồng (CuSO<sub>4</sub>) của cá khoang cổ nemo (*Amphiprion ocellaris*) thương mại. Cá thí nghiệm chiều dài trung bình 33,05 ± 3,2 mm. Năm nghiệm thức cho ăn chứa hàm lượng Astaxanthin bổ sung khác nhau: 0 (đối chứng), 50, 100, 150, 200 mg/kg thức ăn. Sau 8 tuần thí nghiệm, hàm lượng Astaxanthin tích lũy trong cơ-da cá nemo thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng 2,11 ± 0,13 µg/g, trong khi ở nghiệm thức 150 và 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn đạt trên 10 µg/g. Bổ sung 150 và 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn làm tăng khả năng chịu sốc độ muối và kháng lại độc tố đồng của cá nemo. Cá chống chịu được lâu hơn (>50 phút) so với nghiệm thức đối chứng (42,4 phút) trong môi trường có độ muối 0‰ (p<0,05); Tỷ lệ cá chết dưới 68% thay vì 100% ở nghiệm thức đối chứng sau 5 và 7 ngày nuôi trong môi trường 5‰ và 10‰ tương ứng (p<0,05). Tỷ lệ sống trên 75% cao hơn hẳn so với nhóm đối chứng (54%) khi sốc trong môi trường Cu<sup>2+</sup> - 96 h (p<0,05). Tuy nhiên, không có sự khác biệt về lượng Astaxanthin tích lũy và khả năng chịu sốc ở hai nghiệm thức bổ sung 150, 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn (p>0,05). Như vậy, Hàm lượng tối ưu bổ sung astaxanthin vào thức ăn cho cá nemo thương mại là 150 mg/kg đã tạo nên sự tích lũy sắc tố cao trong cơ-da; làm tăng khả năng chịu sốc độ muối và kháng lại độc tố đồng.

**Từ khóa:** Astaxanthin, cá khoang cổ nemo, sắc tố, sốc độ muối, sốc đồng.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Astaxanthin là một loại carotenoid có mặt trong cơ thể một số loài thủy sản, làm cho cơ, da và trứng của chúng có màu vàng, cam hay đỏ [1]. Các loài cá và giáp xác không thể tự tổng hợp được carotenoid. Vì vậy, Astaxanthin phải có sẵn trong môi trường sống tự nhiên hoặc được bổ sung từ nguồn thức ăn của chúng [2, 3]. Vai trò của Astaxanthin trong nuôi trồng thủy sản đang ngày càng được quan tâm và nhiều nghiên cứu đã hướng tới việc xác định các chức năng sinh học khác của Astaxanthin [4]. Ngoài việc tạo màu sắc cho vật nuôi thủy

sản để đáp ứng thị hiếu của người tiêu dùng, Astaxanthin còn đảm nhận nhiều chức năng khác như bảo vệ cơ thể chống lại sự oxy hóa, sinh sản và phát triển [5, 6] đáp ứng miễn dịch và đề kháng bệnh [5]. Hiện nay, để duy trì và làm cho màu sắc cá cảnh tươi hơn, sống động hơn, trong môi trường bể nuôi cần phải cung cấp cho chúng một chế độ dinh dưỡng có những chất bổ sung màu hiệu quả. Astaxanthin là sắc tố thường được sử dụng nhất do hiệu quả đa dạng của nó đến sức khỏe vật nuôi thủy sản bên cạnh khả năng tạo màu. Nhiều nghiên cứu cho thấy hàm lượng tối ưu Astaxanthin trong

thức ăn sẽ tạo nên sự tích lũy cao nhất trong cơ thể [7-10].

Cá khoang cổ nemo là loài cá phổ biến và rất được ưa chuộng trên thị trường cá cảnh nhờ màu sắc, hình dạng đẹp và dễ thích nghi trong điều kiện nuôi giữ [11]. Một số nghiên cứu về vai trò của Astaxanthin đến màu sắc và tăng trưởng của cá nemo đã được tiến hành. Khi phân tích màu sắc và hàm lượng sắc tố trong cơ và da cá, Tanaka và nnk., (1992) đã kết luận rằng Astaxanthin là sắc tố chủ yếu trong các loại carotenoid tồn tại ở loài cá này [12]. Astaxanthin tạo màu sắc đẹp cho cá nemo [13, 14], tuy nhiên lại ít ảnh hưởng đến tăng trưởng và tỉ lệ sống của cá ở giai đoạn 30 ngày tuổi [15]. Tác động của Astaxanthin đến các loài và các giai đoạn khác nhau của động vật thủy sản là khác nhau. Hầu hết ảnh hưởng của Astaxanthin đến khả năng đề kháng với stress môi trường mới được tiến hành ở tôm. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, Astaxanthin giúp tăng cường sức chống chịu của tôm trước sự căng thẳng do thiếu oxy, sốc độ muối [6, 16, 17], sốc nhiệt [6], sốc amoniac và stress bệnh lý [10]. Hiểu biết về ảnh hưởng của Astaxanthin đến sức đề kháng của cá nói chung còn rất hạn chế. Cho đến nay, chưa có một công bố nào về vai trò của Astaxanthin đến khả năng chịu sốc của cá nemo. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này để kiểm tra tác động của việc bổ sung Astaxanthin vào thức ăn đến sự tích lũy sắc tố này trong cơ thể và khả năng kháng lại sự thay đổi điều kiện lý, hóa của môi trường nuôi trên đối tượng cá khoang cổ nemo thương mại.

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Đối tượng nghiên cứu.** Cá nemo (*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830) được sản xuất tại trại thực nghiệm Phòng Công nghệ Nuôi trồng thuộc Viện Hải dương học.

**Thức ăn cho cá thí nghiệm.** Thức ăn công nghiệp NRD 5/8 (INVE) với hàm lượng protein >55%, lipid >9%, chất xơ <1,9%, độ ẩm <8%, tro <14,5% được sử dụng như một chế độ ăn cơ bản. Thức ăn chế biến cho 5 nghiệm thức được bổ sung hàm lượng Astaxanthin khác nhau: 0 (đối chứng), 50, 100, 150 và 200 mg/kg thức ăn tương ứng với nghiệm thức 1 đến nghiệm thức 5. Astaxanthin được sử dụng trong thí nghiệm có tên thương mại là Carophyll Pink 10% CWS

(Thụy Sĩ). Thức ăn sau chế biến được sấy khô và bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng. Cá được cho ăn thức ăn tương đương 5% khối lượng cơ thể vào các thời điểm 8 h và 16 h trong ngày. Thức ăn thừa và chất thải trong bể nuôi sẽ được vệ sinh sau khi cho ăn khoảng 1 h.

**Thiết kế thí nghiệm.** Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu được thể hiện ở hình 1.

Chọn 550 cá thể nemo có kích cỡ thương mại ( $\geq 30$  mm), khỏe mạnh có chiều dài trung bình là  $33,05 \pm 3,29$  mm cho nghiên cứu này. Trong đó:

100 con được nuôi trong bể kính thể tích 300 L và cho ăn thức ăn công nghiệp NRD 5/8 (INVE) trong 6 tuần để xác định  $LC_{50} - 96$  h của  $Cu^{2+}$  đối với cá nemo. Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp nước tĩnh và không thay nước trong 96 h với 5 nồng độ  $Cu^{2+}$  từ 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/L và 1 đối chứng (0 mg/L) bằng phương pháp hòa tan  $CuSO_4$  vào môi trường nước. Mỗi nồng độ được lặp lại ngẫu nhiên trong 3 bể 30 L với 15 cá thể khỏe mạnh (tương đương 5 con/bể 30 L). Trong suốt thời gian thí nghiệm cá không được cho ăn. Theo dõi và ghi nhận số cá chết sau 96 h. Giá trị  $LC_{50-96}$  h sẽ được tính bằng phương pháp Probit [18] sử dụng phần mềm SPSS 18.0.

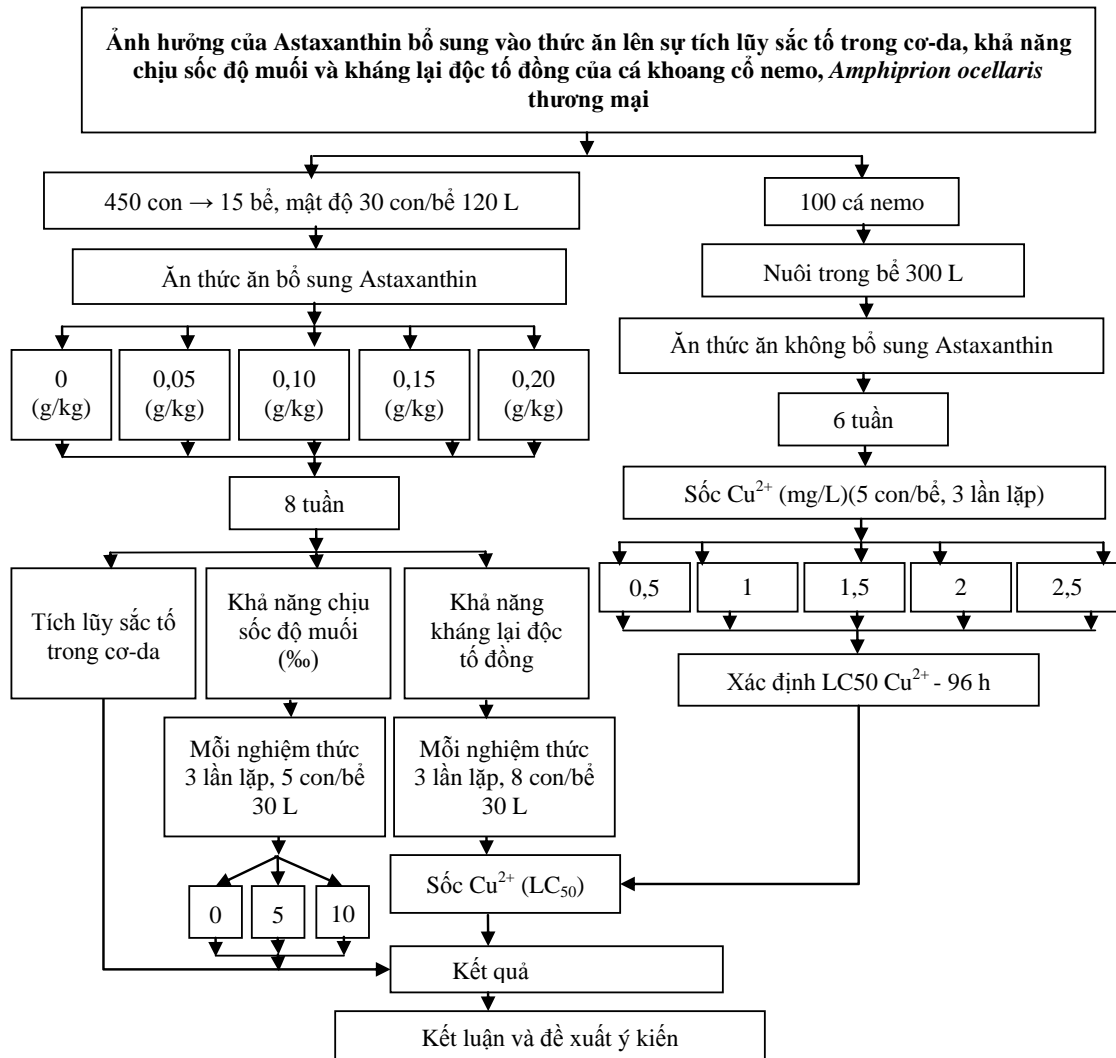
450 con được phân bố ngẫu nhiên vào 15 bể thí nghiệm, mật độ 30 con/bể. Với 5 nghiệm thức: 0 (đối chứng), 50, 100, 150 và 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn. Mỗi nghiệm thức gồm 3 bể ngẫu nhiên và được cho ăn thức ăn tương ứng với từng nghiệm thức. Sau 8 tuần nuôi cá được dùng để thực hiện 2 thí nghiệm sau:

Thí nghiệm I (thí nghiệm sốc độ muối): Trong 8 tuần thí nghiệm, độ muối của môi trường nuôi dao động từ 33 - 35 và không có sự sai khác đáng kể giữa các bể nuôi. Kiểm tra khả năng chịu sốc độ muối của cá (sử dụng cá ở 5 nghiệm thức của thí nghiệm I) bằng cách chuyển nhanh cá từ môi trường nuôi sang môi trường có độ muối 0, 5, 10‰, với mỗi độ muối chuyển 15 cá thể trong mỗi nghiệm thức (5 con/bể), mỗi bể có thể tích  $V = 30$  L. Theo dõi và ghi chép đầy đủ biểu hiện của cá, theo dõi thời điểm cá chết và số lượng cá chết. Với độ muối 0‰: Kiểm tra và ghi nhận thời gian sống của cá ở các nghiệm thức. Với độ muối 5 và 10‰: Xác định thời gian để cá ở một trong các nghiệm thức chết

100%. Từ đó tính tỉ lệ chết tích lũy của cá ở các nghiệm thức còn lại.

Thí nghiệm II (thí nghiệm sốc đồng (CuSO<sub>4</sub>): Sau 8 tuần thí nghiệm, chọn 24 cá thể của mỗi nghiệm thức (tương đương 8 cá

thể/bể 30 L) chuyển sang nuôi trong môi trường chứa độc tố đồng với nồng độ Cu<sup>2+</sup> bằng giá trị LC<sub>50</sub> đã xác định được. Trong thời gian thí nghiệm cá không được cho ăn. Quan sát, ghi lại tỉ lệ sống của cá sau 96 h.



Hình 1. Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu

**Thu thập số liệu.** Các chỉ tiêu môi trường: Nhiệt độ (°C), pH, độ mặn (‰), được xác định bằng máy Horiba U10 (1 lần/ngày vào lúc 14 h), chỉ số TAN xác định bằng phương pháp Indophenol blue. Trong quá trình nuôi thí nghiệm các yếu tố môi trường nước ít dao động (bảng 1), nằm trong giới hạn thích ứng cho sự sinh trưởng và phát triển của cá khoang cổ nemo.

Sau 8 tuần thí nghiệm, cá ở các nghiệm thức thí nghiệm đạt tỷ lệ sống cao, trên 90% (bảng 2), số cá này được sử dụng để đánh giá hàm lượng Astaxanthin tích lũy trong da - cơ cá và khả năng chịu sốc của cá với độ muối và độc tố đồng.

Phân tích hàm lượng Astaxanthin tích lũy trong cơ, da (sử dụng 9 cá thể cho mỗi nghiệm thức) của cá theo phương pháp của Chen và Meyers (1984) [19].

Bảng 1. Các yếu tố môi trường trong thời gian nuôi thí nghiệm

Nhiệt độ (°C)	Độ mặn (‰)	pH	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	DO (mg/l)
27-29 (28,51±0,12)	33-35 (33,51±0,16)	7,8-8,3	0-0,01	4,5-5,8 (4,92±0,26)

Bảng 2. Ảnh hưởng của Astaxanthin đến tỷ lệ sống của cá khoang cổ nemo

Tỷ lệ sống	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 4	Lô 5
S (%)	94,33±2,963	95,33±2,333	96,67±2,028	96,67±2,028	94,33±1,333

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn.

Hàm lượng Astaxanthin được tính theo công thức của Kelly - Harmon 1972 [20]:

$$Y = \frac{A.D.10^4}{E_{1cm}^{1\%}.d.G}$$

Trong đó: Y: µg/g Astaxanthin/khối lượng tươi; A: Độ hấp thụ của dung dịch ở 476 nm; D: Thể tích dịch chiết thu được (ml); G: Khối lượng tươi của cơ, da (g); d: Bề dày của cuvet (d=1 cm); E: Hệ số tắt của Astaxanthin (tức độ hấp thụ của dung dịch Astaxanthin 1% với cuvet 1 cm) trong dung môi PE.

Tỷ lệ chết tích lũy được tính theo công thức:

$$M(\%) = \frac{Md}{N_0} \times 100$$

Trong đó: Md- Số cá chết lũy tính đến thời điểm d (con); N<sub>0</sub>- Số cá thí nghiệm ban đầu (con).

**Phương pháp xử lý số liệu.** Sử dụng phương

pháp phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA) trên phần mềm SPSS 18.0 để so sánh sự khác nhau giữa các nghiệm thức thí nghiệm với độ tin cậy 95%. Số liệu được biểu diễn chủ yếu dưới dạng Giá trị trung bình ± Sai số chuẩn (SE).

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

**Hàm lượng Astaxanthin tích lũy.** Phân tích hàm lượng Astaxanthin thực tế trong thức ăn được sử dụng cho các nghiệm thức cho thấy: thức ăn công nghiệp NRD 5/8 (INVE) được sử dụng có chứa một lượng nhỏ Astaxanthin (15,17 mg/kg). Sỡ dĩ trong thức ăn đối chứng có chứa một lượng nhỏ Astaxanthin có thể là do các thành phần tạo nên thức ăn có chứa Astaxanthin, mặc dù vậy lượng Astaxanthin này rất nhỏ (15,17 ± 0,52 mg/kg) nên không ảnh hưởng đáng kể đến kết quả thí nghiệm. Đồng thời, chênh lệch giữa liều lượng bổ sung và lượng Astaxanthin tương ứng trong thức ăn không đáng kể (bảng 3). Điều này đảm bảo cho tính chính xác của nghiên cứu.

Bảng 3. Lượng Astaxanthin trong thức ăn và tích lũy trong cơ thể cá

Nghiệm thức (mg/kg)	0	50	100	150	200
Astaxanthin - Thức ăn (µg/g)	15,17 ± 0,52 <sup>a</sup>	61,70 ± 0,43 <sup>b</sup>	114,72 ± 0,46 <sup>c</sup>	160,52 ± 1,01 <sup>d</sup>	207,44 ± 0,67 <sup>e</sup>
Astaxanthin - Cơ, da cá (µg/g)	2,11 ± 0,13 <sup>a</sup>	4,88 ± 0,30 <sup>b</sup>	7,52 ± 0,48 <sup>c</sup>	10,49 ± 0,16 <sup>d</sup>	11,15 ± 0,28 <sup>d</sup>

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn. Số liệu cùng hàng có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Sau 8 tuần nuôi thử nghiệm, hàm lượng sắc tố Astaxanthin tích lũy trong cơ và da cá nemo tích lũy thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng 2,11 ± 0,13 µg/g, trong khi ở nghiệm thức 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn lên đến 11,15 ±

0,28 µg/g (p<0,05). Tuy nhiên, không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức thức ăn bổ sung 200 và 150 mg Astaxanthin/kg thức ăn (p>0,05).

**Ảnh hưởng của Astaxanthin đến khả năng chịu sốc độ muối của cá nemo.** Trong 8 tuần thí nghiệm, độ muối của môi trường nuôi dao động từ 33‰ đến 35‰ (bảng 1) và không có sự khác biệt đáng kể giữa các bể nuôi.

Khi chuyển từ bể nuôi sang môi trường có độ muối 0‰, cá nemo ở các nghiệm thức khác

nau đều chết trong vòng 1 h (bảng 4). Không có sự khác biệt có ý nghĩa về thời gian sống của cá ở các nghiệm thức 0, 50, 100 mg/kg ( $p>0,05$ ). Tuy nhiên, ở nghiệm thức cá ăn thức ăn chứa 150, 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn, cá chống chịu được lâu hơn ( $>50$  phút) so với nghiệm thức đối chứng (42,4 phút) ( $p<0,05$ ).

**Bảng 4.** Thời gian sống của cá ở các nghiệm thức khác nhau khi sốc độ muối từ 33‰ xuống 0‰

Nghiệm thức (mg/kg)	0	50	100	150	200
Thời gian sống (phút)	42,4 ± 1,44 <sup>a</sup>	44 ± 1,00 <sup>a</sup>	46,4 ± 1,63 <sup>ab</sup>	51,8 ± 2,27 <sup>b</sup>	50,2 ± 2,87 <sup>b</sup>

*Ghi chú:* Số liệu trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn. Số liệu cùng hàng có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ )

Tỷ lệ chết tích lũy khi độ muối thay đổi một cách đột ngột từ 33‰ xuống 5‰ sau 5 ngày và 33 xuống 10‰ sau 7 ngày được thể hiện ở bảng 5. Không có sự khác biệt có ý nghĩa về tỉ lệ chết tích lũy của cá ở các nghiệm thức bổ sung Astaxanthin 0, 50, 100 mg/kg sau 5 ngày chuyển sang môi trường có độ muối 5‰ ( $p>0,05$ ). Có sự cải thiện đáng kể về tỷ lệ chết ở nghiệm thức 150 và 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn so với nghiệm thức đối chứng ( $p<0,05$ ), tỷ lệ này nhỏ hơn 68% ở nghiệm thức 150 và

200 mg Astaxanthin/kg thức ăn, thay vì 100% ở nghiệm thức đối chứng. Khi sốc trong môi trường độ muối 10‰, cá nemo ở nhóm đối chứng và nghiệm thức bổ sung 50 mg Astaxanthin/kg thức ăn đều chết 100% trong vòng 7 ngày. Ở ba nghiệm thức còn lại, tỉ lệ chết tích lũy của cá thấp hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức bổ sung 50 mg Astaxanthin/kg thức ăn ( $p<0,05$ ), tuy nhiên sự sai khác giữa các nhóm này là không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ).

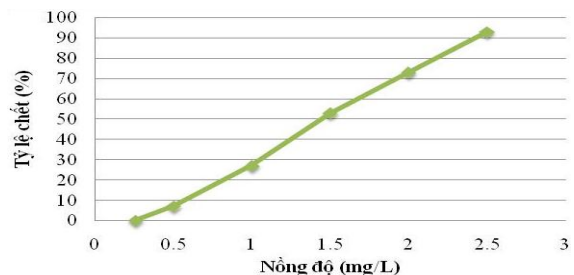
**Bảng 5.** Tỷ lệ chết tích lũy của cá sau 5 ngày với độ muối 5‰ và 7 ngày với độ muối 10‰

	Số ngày chịu sốc	Độ muối	Nghiệm thức (mg/kg)				
			0	50	100	150	200
Tỷ lệ chết (%)	5	5‰	100± 0 <sup>a</sup>	93 ± 7 <sup>a</sup>	87 ± 7 <sup>ab</sup>	60 ± 12 <sup>c</sup>	67 ± 7 <sup>bc</sup>
	7	10‰	100± 0 <sup>a</sup>	100± 0 <sup>a</sup>	73 ± 7 <sup>b</sup>	67 ± 7 <sup>b</sup>	67 ± 7 <sup>b</sup>

*Ghi chú:* Số liệu trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn. Số liệu cùng hàng có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p<0,05$ ).

**Ảnh hưởng của Astaxanthin đến khả năng kháng lại độc tố đồng CuSO<sub>4</sub> của cá nemo.** Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ Cu<sup>2+</sup> càng cao thì tỷ lệ chết càng cao. Nồng độ Cu<sup>2+</sup> thấp (0,256 mg/L) không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của cá (tỷ lệ chết 0%) (hình 2). Giá trị LC<sub>50</sub> của Cu<sup>2+</sup> - 96 h đối với cá nemo trong nghiên cứu này được xác định là 1,43 mg/L (tương đương 5,57 mg/L đối với CuSO<sub>4</sub>).

Tỉ lệ sống của cá ở các nghiệm thức khi nuôi trong môi trường chứa Cu<sup>2+</sup> được pha với nồng độ 1,43 mg Cu<sup>2+</sup>/L nước sau 96 h được ghi nhận ở bảng 6.



**Hình 2.** Tỷ lệ chết tích lũy của nemo theo nồng độ đồng thí nghiệm sau 96 giờ

Ở các nghiệm thức bổ sung 0, 50, 100 mg Astaxanthin/kg thức ăn không có sự sai khác về

tỉ lệ sống của cá sau 96 h nuôi trong môi trường chứa độc tố đồng ( $p>0,05$ ). Tỉ lệ sống của cá ở các nghiệm thức 150, 200 mg/kg tương ứng là 75% và 79% cao hơn hẳn so với nhóm đối chứng (54%) ( $p<0,05$ ), tuy nhiên sự sai khác giữa hai nghiệm thức này là không có ý nghĩa

( $p>0,05$ ). Như vậy có thể thấy, bổ sung Astaxanthin với hàm lượng 150 và 200 mg/kg trong thức ăn giúp tăng khả năng chống chịu của cá nemo với độc tố đồng trong môi trường so với nghiệm thức đối chứng.

Bảng 6. Tỉ lệ sống của cá ở các nghiệm thức sau 96 h nuôi trong môi trường độc tố đồng

Nghiệm thức (mg/kg)	0	50	100	150	200
Tỉ lệ sống (%)	54 ± 4 <sup>a</sup>	63 ± 7 <sup>ab</sup>	67 ± 4 <sup>ab</sup>	75 ± 7 <sup>bc</sup>	79 ± 4 <sup>bc</sup>

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn. Số liệu cùng hàng có các chữ cái khác nhau thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ).

## THẢO LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh được mối liên hệ giữa hàm lượng Astaxanthin tích lũy trong cơ và da cá khoang cổ nemo với liều lượng sắc tố được bổ sung vào thức ăn. Bổ sung 150 và 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn mang đến sự tích lũy cao so với các nghiệm thức bổ sung với hàm lượng Astaxanthin thấp hơn. Tuy nhiên, với lượng bổ sung cao hơn 150 mg Astaxanthin/kg thức ăn thì sự tích lũy sắc tố này tăng thêm không đáng kể. Điều này hoàn toàn phù hợp với nhận định của Ben và nnk., (2009), bổ sung Astaxanthin với liều lượng cao hơn mức tối ưu không làm tăng thêm hiệu quả Astaxanthin đối với vật nuôi [21]. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự với nghiên cứu của Alireza và Bijan (2015) ở tôm thẻ chân trắng [22], lượng Astaxanthin tích lũy trong cơ thể tôm ăn các khẩu phần chứa Astaxanthin bổ sung là 100 và 200 mg/kg cao hơn so với nhóm ăn thức ăn bổ sung 50 mg/kg và nhóm đối chứng. Tuy nhiên giữa hai nghiệm thức này lại không có sự khác biệt có ý nghĩa về lượng Astaxanthin tích lũy ( $p>0,05$ ). Thử nghiệm trên tôm he Nhật Bản, Yamada và nnk., (1990) cũng đã kết luận rằng, khi lượng Astaxanthin bổ sung tăng từ 0 đến 200 ppm, sự tích tụ Astaxanthin cũng tăng lên đạt tối đa là 29,1 mg/kg khối lượng thân [23]. Tuy nhiên, khi lượng bổ sung cao hơn 200 ppm thì hàm lượng tích tụ trong mô không tăng, như vậy lượng Astaxanthin đã đạt tới ngưỡng bão hòa. Pan và Yew (2004) cũng đã thu được kết quả tương tự khi nghiên cứu về tôm sú [24].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi chuyển sang các môi trường có độ muối thay đổi đột

ngột thì độ muối càng thấp, thời gian cá chết càng nhanh. Tuy nhiên việc bổ sung Astaxanthin vào thức ăn với các hàm lượng 150, 200 mg/kg đã làm tăng cường sức sống và giảm tỉ lệ chết tích lũy của cá so với nhóm ăn thức ăn không bổ sung. Kết quả của nghiên cứu này hoàn toàn tương đồng với nghiên cứu trước kia của Darachai và nnk., (1998). Darachai và nnk., (1998) cho rằng bổ sung Astaxanthin vào thức ăn giúp kéo dài thời gian sống của tôm khi chịu sốc độ muối (từ 32‰ xuống 2‰ trong 2 h), các nhóm tôm ăn thức ăn có bổ sung Astaxanthin có thời gian mà tỉ lệ chết tích lũy là 50% lâu hơn (37 - 44 phút) so với nhóm đối chứng (32 phút) [16].

Mặc dù đồng là một nguyên tố vi lượng cần thiết cho các loài sinh vật trong đó có cá, tuy nhiên, ở nồng độ cao, đồng là một trong các kim loại độc hại nhất đối với cá vì gây ảnh hưởng đến sự tăng trưởng, hoạt động của enzyme và sinh sản [25, 26]. Ảnh hưởng của nồng độ  $Cu^{2+}$  trong môi trường đến cá nemo giai đoạn cá bột đã được nghiên cứu bởi Furuta và nnk., (2005) cho thấy, nồng độ  $Cu^{2+}$  tăng từ 0-160  $\mu\text{g/l}$  đã làm tăng dần tỉ lệ sống của cá. Đặc biệt, tỉ lệ sống của cá ở nồng độ 160  $\mu\text{g/l}$  là 80% cao hơn hẳn so với đối chứng (30%). Ở nồng độ cao hơn thì tỉ lệ sống của cá giảm nhanh [27]. Các loài khác nhau chịu ảnh hưởng của đồng khác nhau phụ thuộc vào độ tuổi, kích thước, phương pháp thử nghiệm và chất lượng nước [28, 29]. Giá trị  $LC_{50}$  của  $Cu^{2+}$  - 96 h đối với cá nemo trong nghiên cứu này được xác định là 1,43 mg/L. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nhận định của Bryan (1976). Theo Bryan (1976) thì giá trị  $LC_{50}$  - 96 h của  $Cu^{2+}$  đối

với cá biển và giáp xác dao động từ 0,2 - 3 mg/L [30]. Astaxanthin bổ sung vào thức ăn với hàm lượng 150, 200 mg/kg đã làm tăng tỉ lệ sống sót của cá nemo so với nhóm đối chứng khi nuôi trong môi trường chứa  $\text{Cu}^{2+}$  nồng độ 1,43 mg/L. Như vậy, bổ sung Astaxanthin vào thức ăn làm tăng sức đề kháng của cá nuôi khi chống chịu với độc tố  $\text{Cu}^{2+}$ .

Ngoài ra, một số nghiên cứu vai trò của Astaxanthin lên khả năng chịu sốc một số đối tượng nuôi thủy sản đã được chứng minh. Chien và nnk., (1999) cho thấy, tôm cho ăn một khẩu phần có chứa hàm lượng cao hơn của Astaxanthin thì tỉ lệ sống sót cao hơn so với nhóm đối chứng trước sự thay đổi của nồng độ oxy hòa tan ( $< 1$  mg/L trong 4 h) [31]. Nghiên cứu của Díaz và nnk., (2014) kết luận rằng Astaxanthin như một chất bảo vệ giúp tôm chống lại căng thẳng do nitrit [32].

Theo Darachai và nnk., (1998) sự thay đổi đột ngột về môi trường đòi hỏi vật nuôi thủy sản tiêu tốn nhiều năng lượng hơn để duy trì sự ổn định áp suất thẩm thấu. Điều này làm tăng cường sự có mặt của các gốc oxy hóa trong cơ thể chúng [16]. Và vì, Astaxanthin trong cấu trúc có nhiều nối đôi (13 nối đôi) với một quỹ đạo electron không ổn định nên Astaxanthin là một chất chống oxy hóa rất mạnh, giúp bảo vệ cơ thể bằng cách kết hợp với các gốc tự do để vô hiệu hóa chúng [33]. Vì thế, bổ sung Astaxanthin giúp tăng cường sức đề kháng của vật nuôi với căng thẳng do sự thay đổi điều kiện hóa, lý môi trường gây ra. Điều này giải thích vì sao bổ sung Astaxanthin vào thức ăn đã làm tăng khả năng chịu sốc (độ muối và  $\text{Cu}^{2+}$ ) của cá nemo thương mại.

Astaxanthin bổ sung vào thức ăn với hàm lượng 150, 200 mg/kg đã làm tăng sắc tố tích lũy trong cơ thể và tăng khả năng chịu sốc (độc tố đồng và sự thay đổi đột ngột độ muối) so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên giữa hai nghiệm thức này thì ảnh hưởng của Astaxanthin lại không có sự khác biệt. Điều này có thể là do hàm lượng bổ sung Astaxanthin 150 mg/kg đã tạo nên sự tích lũy cao gần mức bão hòa của sắc tố này trong cơ và da cá nên việc bổ sung thêm thì hiệu quả của Astaxanthin cũng không tăng thêm. Ở các nghiệm thức bổ sung 50, 100 mg/kg thì ảnh hưởng của Astaxanthin đến khả năng chịu sốc của cá lại không thể hiện rõ

so với nhóm đối chứng. Như vậy, việc sử dụng Astaxanthin dưới mức yêu cầu cần thiết của cơ thể vật nuôi thường không mang lại hiệu quả tối ưu của Astaxanthin, trong khi sử dụng trên mức cần thiết giá thành sản xuất sẽ cao do lãng phí và lợi nhuận sẽ giảm. Liều lượng Astaxanthin trong cơ thể quá cao thì cá và giáp xác sẽ tự thải ra môi trường và làm tăng chi phí sản xuất. Vì thế, để mang lại hiệu quả cao và có lợi nhất chúng tôi khuyến cáo nên bổ sung Astaxanthin với nồng độ 150 mg/kg thức ăn trong nuôi cá nemo thương mại.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

**Kết luận.** Hàm lượng Astaxanthin tích lũy trong cơ-da ở nghiệm thức bổ sung 150 và 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn đạt trên 10  $\mu\text{g/g}$  thay vì  $2,11 \pm 0,13$   $\mu\text{g/g}$  ở nghiệm thức đối chứng.

Bổ sung 150 và 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn làm tăng khả năng chịu sốc độ muối của cá nemo. Cá chống chịu được lâu hơn ( $>50$  phút) so với nghiệm thức đối chứng (42,4 phút) trong môi trường có độ muối 0‰; Tỷ lệ cá chết dưới 68% thay vì 100% ở nghiệm thức đối chứng sau 5 và 7 ngày nuôi trong môi trường độ muối 5‰ và 10‰ tương ứng.

Astaxanthin bổ sung vào thức ăn đã cải thiện khả năng chịu sốc với độc tố đồng của cá nemo. Tỉ lệ sống của cá ở các nghiệm thức 150, 200 mg Astaxanthin/kg thức ăn tương ứng là 75% và 79% cao hơn hẳn so với nhóm đối chứng (54%) khi sốc trong môi trường  $\text{Cu}^{2+}$  - 96 h của cá nemo.

Hàm lượng tối ưu bổ sung Astaxanthin vào thức ăn cho cá nemo thương mại là 150 mg/kg làm tăng sắc tố trong cơ thể và khả năng chịu sốc (độ muối, đồng) sau 8 tuần nuôi.

**Kiến nghị.** Cần có những nghiên cứu tiếp theo để xác định liệu trình sử dụng trong chu kỳ nuôi thích hợp cho cá nemo thương mại nhằm giảm chi phí cho người nuôi nhưng không làm giảm vai trò của Astaxanthin.

Cần có những nghiên cứu tiếp theo về vai trò của Astaxanthin đến khả năng miễn dịch của cá nemo nói riêng và cá cảnh nói chung.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Hải dương học, Phòng Công nghệ Nuôi trồng đã tạo điều kiện thuận

lợi nhất về thời gian, cơ sở vật chất và trang thiết bị thí nghiệm để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., and Goycoolea, F. M., 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**(2), 185-196.
2. Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G., and Schlipalius, L. E., 2001. Effects of  $\beta$ - carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, **32**(s1), 182-190.
3. Meyers, S. P., 1994. Developments in world aquaculture, feed formulations and role of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, **66**(5), 1069-1076.
4. Meyers, S. P., and Latscha, T., 1997. Carotenoids. In advances in world aquaculture. Vo. 6. Crustacean Nutrition. *World Aquaculture Society*.
5. Liñán- Cabello, M. A., Paniagua- Michel, J., and Zenteno- Savín, T., 2003. Carotenoids and retinal levels in captive and wild shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, **9**(6), 383-389.
6. Chien, Y. H., Pan, C. H., and Hunter, B., 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*, **216**(1-4), 177-191.
7. Choubert, G., and Storebakken, T., 1989. Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. *Aquaculture*, **81**(1), 69-77.
8. Torrissen, O. J., Christiansen, R., Struksnæs, G., and Estermann, R., 1995. Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. *Aquaculture Nutrition*, **1**(2), 77-84.
9. Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Jimeno, C. D., Vardanis, G., Sterioti, A., and Divanach, P., 2005. The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Research*, **36**(15), 1517-1525.
10. Pan, C. H., Chien, Y. H., and Hunter, B., 2003. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **297**(1), 107-118.
11. Nguyễn Thị Thanh Thủy và Hà Lê Thị Lộc, 2010. Ảnh hưởng của các loại thức ăn lên tỷ lệ sống và tốc độ tăng trưởng của cá khoang cô nemo con (*Amphirion ocellaris* Cuvier, 1830). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển*, **10**(3), 69-75.
12. Tanaka, Y., Yamamoto, A., Kamata, T., and Simpson, K. L., 1992. Biochemical study on the carotenoids in the anemonefish, *Amphiprion* spp. *Memoirs of Faculty of Fisheries-Kagoshima University (Japan)*.
13. Yasir, I., and Qin, J. G., 2010. Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, **41**(3), 308-318.
14. Ho, A. L., O'Shea, S. K., and Pomeroy, H. F., 2013. Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. *Aquaculture International*, **21**(2), 361-374.
15. Seyedi, S. M., Sharifpour, I., Ramin, M., and Jamili, S., 2013. Effect of dietary astaxanthin on survival, growth, pigmentation clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Indian Journal of Fundamental Applied Life Sciences*, **3**(3), 391-395.
16. Darachai, J., Piyatiratitivorakul, S., Kittakoop, P., Nitithamyong, C., and Menasveta, P., 1998. Effects of astaxanthin on larval growth and survival of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Advances in Shrimp Biotechnology*. Pp. 117-21.
17. Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., and Sorgeloos, P., 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*



- (Fabricius). *Aquaculture research*, **29**(8), 579-585.
18. Finney, D. J., 1971. Probit Analysis: 3d Ed. *Cambridge University Press*.
  19. Chen, H. M., and Meyers, S. P., 1984. A rapid quantitative method for determination of astaxanthin pigment concentration in oil extracts. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **61**(6), 1045-1047.
  20. Kelley, C. E., and Harmon, A. W., 1972. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. *US Natl Mar Fish Serv Fish Bull*.
  21. Doolan, B. J., Booth, M. A., Allan, G. L., and Jones, P. L., 2008. Effects of dietary astaxanthin concentration and feeding period on the skin pigmentation of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquaculture Research*, **40**(1), 60-68.
  22. Salarzadeh, A., and Rajabi, B., 2015. The effects of dietary supplementation synthetic Astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *International Journal*, **3**(3), 797-803.
  23. Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M., and Ito, Y., 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids: I. Effect of dietary astaxanthin,  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, **87**(3-4), 323-330.
  24. Pan, C. H., and Chien, Y. H., 2004. Effects of dietary astaxanthin on body astaxanthin, growth and survival of *Penaeus monodon* postlarvae. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, **31**, 269-280.
  25. Sorensen, E. M., 1991. Metal poisoning in fish. *CRC press*.
  26. Nussey, G., Van Vuren, J. H. J., and Du Preez, H. H., 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **111**(3), 369-380.
  27. Furuta, T., Iwata, N., Kikuchi, K., and Namba, K., 2005. Effects of copper on survival and growth of larval false clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*. *Fisheries Science*, **71**(4), 884-888.
  28. McCahon, C. P., and Pascoe, D., 1988. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **15**(3), 245-252.
  29. Hodson, P. V., Dixon, D. G., Spry, D. J., Whittle, D. M., and Sprague, J. B., 1982. Effect of growth rate and size of fish on rate of intoxication by waterborne lead. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **39**(9), 1243-1251.
  30. Bryan, G. T., 1976. Heavy metal contamination in the sea. *Marine Pollution*, **3**, 185-302.
  31. Chien, Y. H., Chen, I. M., Pan, C. H., and Kurmaly, K., 1999. Oxygen depletion stress on mortality and lethal course of juvenile tiger prawn *Penaeus monodon* fed high level of dietary astaxanthin. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, **26**(2), 85-93.
  32. Díaz, A. C., Velurtas, S. M., Espino, M. L., and Fenucci, J. L., 2014. Effect of dietary astaxanthin on free radical scavenging capacity and nitrite stress tolerance of postlarvae shrimp, *Pleoticus muelleri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**(51), 12326-12331.
  33. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, **35**(2), 120-171.

EFFECT OF DIETARY ASTAXANTHIN ON PIGMENT  
ACCUMULATION IN THE MUSCLE-SKIN, RESISTANCE TO  
SALINITY STRESS AND COPPER TOXICITY OF COMMERCIAL  
CLOWNFISH, *Amphiprion ocellaris*

**Ho Son Lam, Phan Thi Ngoc**

*Institute of Oceanography, VAST*

**ABSTRACT:** This study examined the influence of Astaxanthin added in feed on pigment accumulation in the muscle-skin, as well as resistance to salinity stress and copper toxicity of clownfish (*Amphiprion ocellaris*). Mean length of fish was  $33.05 \pm 3.29$  mm. Five experiments were performed with synthetic Astaxanthin contents: 0, 50, 100, 150 and 200 mg/kg diets. After 8 weeks of the experiment, the pigment accumulation of Astaxanthin in the muscle-skin of clownfish was the lowest in the control treatment of  $2.11 \pm 0.13$   $\mu\text{g/g}$ , while these treatments of 150 and 200 mg/kg diets were over 10  $\mu\text{g/g}$ . The treatments of 150 and 200 mg Astaxanthin/kg increased the resistance to copper toxicity and salinity stress test of the fish. The resistance of the fish was longer (>50 minutes) compared to the control (42.4 minutes) in an environment with salinity of 0‰ ( $p < 0.05$ ); The mortality was below 68% instead of 100% in the control after 5 and 7 days of culture in the environment 5‰ and 10‰, respectively ( $p < 0.05$ ). The survival rate of fish was over 75%, respectively, significantly higher than the control (54%) when being cultured in the environment of  $\text{Cu}^{2+}$  - 96 h ( $p < 0.05$ ). However, there were no significant differences in accumulation of Astaxanthin and resistance to the stress test in two treatments of 150, 200 mg/kg diets ( $p > 0.05$ ). Thus, the optimal content of astaxanthin supplement in fish food was 150 mg/kg diet, which created high pigment accumulation in the muscle-skin; increased resistance to salinity stress and copper toxicity.

**Keywords:** Astaxanthin, clownfish, pigment, salinity stress, copper stress.