

VAI TRÒ CỦA KHÁNG SINH ĐẾN HOẠT LỰC TINH TRÙNG CÁ MÚ CỌP (*Epinephelus fuscoguttatus*) SAU KHI BẢO QUẢN TRONG TỦ LẠNH

Lê Minh Hoàng*, Đặng Hoàng Trường

Viện Nuôi trồng Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

*Email**: hoanglm@ntu.edu.vn.com

Ngày gửi bài: 14.03.2015

Ngày chấp nhận: 18.05.2015

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định ảnh hưởng của các loại kháng sinh với liều lượng khác nhau lên hoạt lực tinh trùng cá mú cọp sau khi bảo quản lạnh trong tủ lạnh. Tinh dịch được pha loãng với chất bảo quản ASP (Artificial seminal plasma - dịch tương nhân tạo) ở tỉ lệ 1:3 (Tinh dịch:ASP) trong các ống nhựa Eppendorf. Thí nghiệm bổ sung các loại kháng sinh (Neomycin, Gentamycin, hoặc Penicillin kết hợp với Streptomycin) ở các nồng độ khác nhau lần lượt là 200, 400, 600ppm. Tất cả các ống nhựa Eppendorf chứa mẫu được bảo quản lạnh trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Kết quả cho thấy hoạt lực tinh trùng tốt nhất ở nghiệm thức bổ sung 200ppm Neomycin. Ở nghiệm thức này hoạt lực tinh trùng có thể duy trì hoạt động cho đến ngày thứ 36 trong điều kiện bảo quản ở tủ lạnh.

Từ khóa: Bảo quản lạnh, cá mú cọp, *Epinephelus fuscoguttatus*, hoạt lực tinh trùng, kháng sinh.

Role of Antibiotics on Sperm Motility of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) after Chilled Storage in Refrigerator

ABSTRACT

The study was conducted to determine the effect of different antibiotics on sperm motility following chilled storage of Waigieu seaperch *Epinephelus fuscoguttatus*. Semen were diluted with an extender at a ratio of 1:3 (semen: ASP) in 1.5ml Eppendorf tubes. Experiments were conducted by adding different antibiotics including Neomycin, Gentamycin, or Penicillin plus Streptomycin at concentrations of 200, 400 or 600 ppm. All treatments were refrigerated at 4°C. The results showed that sperm motility was best when 200 ppm Neomycin was added. Sperms remained motile up to 36 days in this experiment.

Keywords: Antibiotic, Tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, cold storage, sperm motility.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bảo quản lạnh tinh trùng trong tủ lạnh là một thao tác kỹ thuật rất hữu ích trong cơ sở sản xuất giống. Thao tác này đã làm giảm quá trình vượt tinh thường xuyên từ con đực và giúp dễ dàng vận chuyển tinh trùng từ nơi này đến nơi khác. Mặt khác, chúng còn giúp ngăn chặn vấn đề không đồng pha chín muồi sinh dục giữa cá cái và cá đực (Billard et al., 2004; Chang et al., 2002; Le et al., 2011; Lê Minh Hoàng và cs., 2013). Quá trình bảo quản lạnh tinh trùng trong tủ lạnh chịu sự ảnh hưởng từ chất bảo quản, tỉ lệ

pha loãng, nhiệt độ bảo quản và kháng sinh (Le et al., 2011; Le et al., 2013; Lim et al., 2006; Lim et al., 2005). Sự hiện diện của vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn trong các mẫu bảo quản trong tủ lạnh có thể làm giảm đi chất lượng tinh trùng cụ thể là giảm khả năng thụ tinh, chất lượng cũng như khả năng tồn tại của tế bào tinh trùng kém (Segovia et al., 2000). Để cải thiện vấn đề này, kháng sinh thường được bổ sung vào các mẫu tinh trùng bảo quản trong tủ lạnh.

Cá mú cọp là loài cá biển có giá trị kinh tế, đã và đang nuôi rộng rãi trên thế giới (Đoàn

Khắc Bộ 2008). Cá được liệt kê vào danh mục cá loài cá biển có giá trị kinh tế (Lê Anh Tuấn, 2004). Đặc biệt, cá mú cộp là loài lưỡng tính cái trước, tức là từ khi nhỏ cho đến lúc thành thục nó là con cái, sau đó chuyển thành con đực. Ngoài ra, loài cá này không đồng pha trong sinh sản nhân tạo, đây là một trở ngại lớn trong công tác sinh sản nhân tạo khi không chủ động được sự đồng pha giữa con đực và con cái. Vì vậy, việc nghiên cứu bảo quản lạnh và lưu trữ tế bào sinh dục thành thục nói chung và tinh trùng cá nói riêng trong tủ lạnh là giải pháp tốt cho việc chủ động sinh sản nhân tạo. Các nghiên cứu về đặc tính và đánh giá hoạt lực tinh trùng của loài cá này đã được thực hiện bởi Hoàng Thị Hiền và Lê Minh Hoàng (2014); Lê Minh Hoàng và cs. (2014). Tuy nhiên, chưa có công trình nghiên cứu nào công bố trên đối tượng này về việc bổ sung kháng sinh trong quá trình bảo quản tinh trùng trong tủ lạnh. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm tìm ra loại cũng như liều lượng thích hợp nhất cho quá trình bảo quản lạnh tinh trùng của loài cá này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu này được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Viện Nuôi trồng thủy sản thuộc Trường Đại học Nha Trang.

2.1. Cá mú đực và vuốt tinh

Cá mú cộp đực được đánh bắt từ tự nhiên và nuôi giữ tại các lồng bè ở Vũng Ngán, Nha Trang. Thức ăn cho cá mú cộp là cá tạp với khẩu phần ăn chiếm 5% khối lượng cơ thể. Trước khi vuốt tinh, cá đực được gây mê bằng Ethylene glycol monophenyl ether với nồng độ 200ppm. Tinh dịch cá được vuốt bằng cách dùng tay ấn nhẹ trên bụng. Tinh dịch thu được chứa trong các ống nhựa có thể tích là 15ml. Trong quá trình vuốt tinh cần đặc biệt chú ý tránh tinh dịch lẫn tạp với nước tiểu và phân. Các ống nhựa thu tinh dịch được giữ lạnh từ 2-4°C trước và ngay sau khi thu tinh dịch.

2.2. Kiểm tra và đánh giá hoạt lực trùng

Hoạt lực tinh trùng được đánh giá bằng việc dùng micropipette hút 1 μ l tinh dịch cho lên lam kính chuyên dụng và thêm 99 μ l nước biển nhân tạo vào để hòa đều rồi quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 400 lần. Hoạt lực tinh trùng được ghi lại bằng máy ghi hình được kết nối với kính hiển vi. Các thông số hoạt lực tinh trùng được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng. Các mẫu tinh trùng có hoạt lực ít nhất 85% mới được dùng cho bảo quản lạnh trong tủ lạnh.

2.3. Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của kháng sinh lên hoạt lực tinh trùng sau khi bảo quản trong tủ lạnh

Để xác định loại và liều lượng kháng sinh tối ưu cho bảo quản lạnh tinh trùng cá mú cộp trong tủ lạnh, tinh dịch được pha loãng với dịch tương nhân tạo (ASP-Artificial seminal plasma) ở tỉ lệ 1 : 3. Thành phần của ASP trong 1000mL nước cất gồm: 0,5g NaCl, 0,02g NaH₂PO₄, 0,01g NaHCO₃, 0,04g KCl, 0,01g CaCl₂.2H₂O, 0,02g MgCl₂.6H₂O, pH 8,1 và áp suất thẩm thấu 320 mOsm.kg⁻¹. Mỗi ống nhựa chứa mẫu lần lượt được bổ sung 1 trong 3 loại kháng sinh (Neomycin hoặc Gentamycin, hoặc kết hợp giữa Penicillin và Streptomycin) ở nồng độ lần lượt cho từng loại kháng sinh là 200, 400 hoặc 600 ppm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Các thông số hoạt lực tinh trùng sau khi bảo quản lạnh ở mỗi ống nghiệm thức được kiểm tra định kỳ 6 ngày/lần cho đến khi tinh trùng ngừng hoạt động.

2.4. Phân tích số liệu

Tất cả các số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm sai số chuẩn (SE). Đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức thí nghiệm được thực hiện bằng phân tích phương sai một nhân tố (one-way ANOVA) từ phần mềm SPSS phiên bản 16.0. So sánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các loại và liều lượng kháng sinh trong quá trình bảo quản lạnh dựa trên phân tích

phương sai (Post Hoc Test) bằng phương pháp kiểm định Duncan's với mức ý nghĩa $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Ảnh hưởng của việc bổ sung Neomycin đến hoạt lực tinh trùng bảo quản lạnh trong tủ lạnh

Hoạt lực (%) và vận tốc của tinh trùng ($\mu\text{m/s}$) ở tỷ lệ pha loãng 1:3, thang nhiệt độ 4°C trong ASP có bổ sung Neomycin với các liều lượng khác nhau được minh họa qua hình 1.

Qua hình 1 cho thấy tinh trùng bảo quản có bổ sung Neomycin ở liều lượng 200ppm có hoạt lực và tốc độ tốt nhất lần lượt là 4,00% và 56,00 $\mu\text{m/s}$ kéo dài đến ngày thứ 36; thấp nhất ở liều lượng 600ppm có hoạt lực và vận tốc kéo dài đến ngày thứ 30. Và ở nghiệm thức đối chứng chỉ có thời gian sống đến ngày thứ 18.

Sau 1 ngày bảo quản hoạt lực của tinh trùng trong ASP với tỷ lệ 1:3 ở nhiệt độ 4°C không có sự sai khác. Đến ngày thứ 6 thì hoạt lực của tinh trùng trong ASP với tỷ lệ 1:3 ở các liều lượng Neomycin khác nhau có sự sai khác

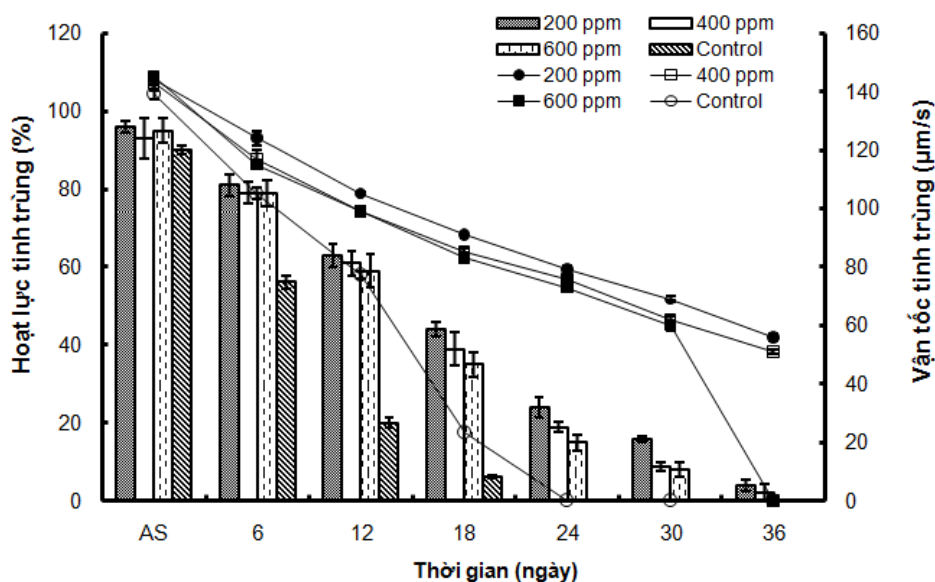
hoàn toàn với nhau. Tuy nhiên, hoạt lực, vận tốc và thời gian sống của tinh trùng bảo quản ở liều lượng 200ppm tốt nhất, kéo dài đến ngày thứ 36.

3.2. Ảnh hưởng của việc bổ sung Gentamycin đến hoạt lực tinh trùng bảo quản trong tủ lạnh

Hoạt lực tinh trùng (%) và vận tốc tinh trùng ($\mu\text{m/s}$) ở tỷ lệ pha loãng 1:3, thang nhiệt độ 4°C trong ASP, bổ sung Gentamycin với các liều lượng khác nhau được thể hiện qua hình 2.

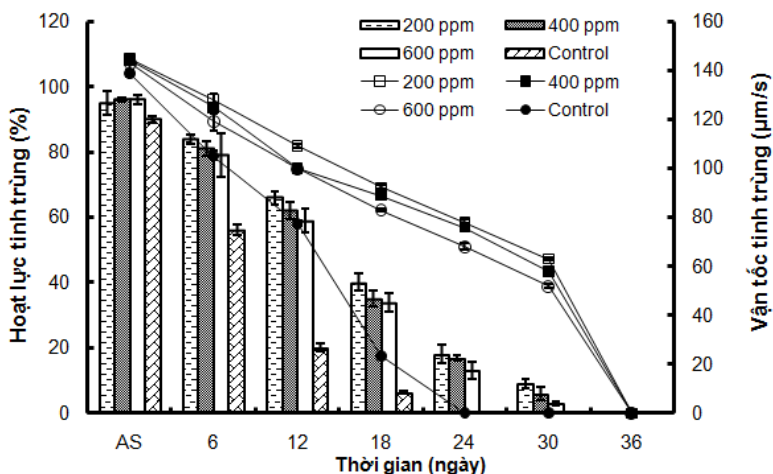
Sau 1 ngày bảo quản hoạt lực của tinh trùng trong ASP với tỷ lệ 1:3 ở nhiệt độ 4°C không có sự sai khác. Đến ngày thứ 6, hoạt lực của tinh trùng ở các liều lượng Gentamycin khác nhau có sự sai khác với nhau.

Với công thức bổ sung gentamycin liều lượng 200ppm, tinh trùng có hoạt lực và tốc độ tốt nhất lần lượt là 9,00% và 63,00 $\mu\text{m/s}$ kéo dài đến ngày thứ 30; thấp nhất ở liều lượng 600ppm kéo dài thời gian sống đến ngày thứ 30. Ở nghiệm thức đối chứng tinh trùng chỉ sống đến ngày thứ 18.



Hình 1. Hoạt lực (%) và vận tốc tinh trùng ($\mu\text{m/s}$) có bổ sung Neomycin

Ghi chú: Control: nghiệm thức đối chứng không có bổ sung Neomycin. AS: Sau khi bảo quản.



Hình 2. Hoạt lực (%) và vận tốc tinh trùng (µm/s) có bổ sung Gentamycine

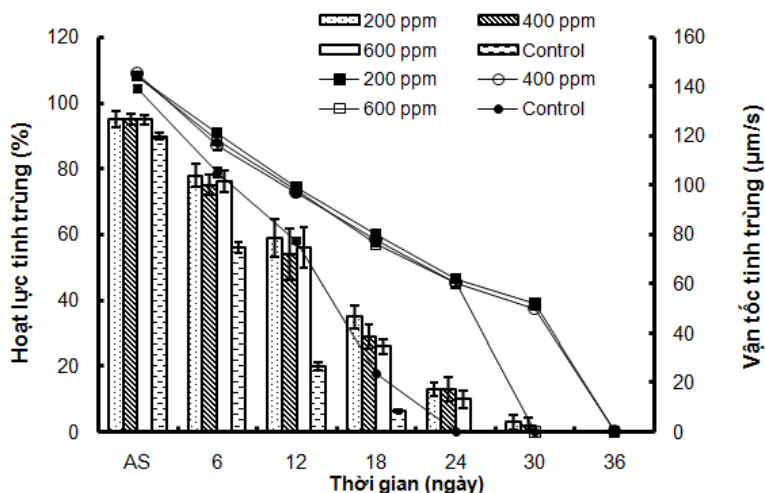
Ghi chú: Control: nghiệm thức đối chứng không có bổ sung Gentamycin. AS: Sau khi bảo quản.

3.3. Ảnh hưởng của việc bổ sung Penicillin + Streptomycin với các liều lượng khác nhau

Hoạt lực tinh trùng và vận tốc tinh trùng sau khi bảo quản lạnh có bổ sung Penicillin kết hợp với Streptomycin ở các liều lượng khác nhau được minh họa qua hình 3.

Sau 1 ngày bảo quản, hoạt lực của tinh trùng trong ASP với tỷ lệ 1:3 ở nhiệt độ 4°C không có sự sai khác. Đến ngày thứ 6 thì hoạt

lực của tinh trùng ở các liều kháng sinh bổ sung Penicillin + Streptomycin khác nhau có sự sai khác nhau. Tuy nhiên, hoạt lực, vận tốc của tinh trùng bảo quản ở liều lượng 200ppm đạt tốt nhất với các giá trị tương ứng là 3,00%, 52,00µm/s và kéo dài thời gian sống đến ngày thứ 36. Liều 600ppm chỉ kéo dài thời gian sống của tinh trùng đến ngày 24. Không dùng kháng sinh trong bảo quản lạnh chỉ kéo dài thời gian sống của tinh trùng được 18 ngày.



Hình 3. Hoạt lực (%) và vận tốc tinh trùng (µm/s) có bổ sung Penicillin + Streptomycin

Ghi chú: Control: nghiệm thức đối chứng không có bổ sung Penicillin+Streptomycin. AS: Sau khi bảo quản.

4. THẢO LUẬN

Việc bổ sung kháng sinh vào tinh dịch không pha loãng hay pha loãng đều cải thiện tốt thời gian bảo quản lạnh (Billard et al., 2004; Bobe and Labbe 2009; Le et al., 2011; Le et al., 2013). Kháng sinh là chất rất cần thiết để kéo dài thời gian bảo quản vì chúng có vai trò hạn chế sự phát triển của vi khuẩn tạp nhiễm trong quá trình thu thập mẫu và bảo quản lạnh (Chang et al., 2002; Le et al., 2011; Le et al., 2013). Theo báo cáo của Chao et al. (1992), hoạt lực tinh trùng cá mú (*Epinephelus malabaricus*) có thể duy trì đến ngày thứ 8 khi chúng được bảo quản trong dung dịch Ringer dùng cho cá biển và bổ sung 500ppm Streptomycin. Đối với tinh trùng cá bơn Đại Tây Dương (*Hippoglossus hippoglossus*), bảo quản lạnh trong tủ lạnh với chất bảo quản là dung dịch nước muối cân bằng của Hanks sau khi đã điều chỉnh tỉ lệ pha loãng 1:9 với Penicillin kết hợp Streptomycin ở nồng độ 200 IU/ml, hoạt lực tinh trùng có thể được duy trì cho đến ngày thứ 70 (Igor et al., 2006). Việc kết hợp giữa 50 IU/ml Penicillin và 50 µg/ml Streptomycin bổ sung vào bảo quản lạnh tinh trùng cá tuyết Đại Tây Dương (*Gadus morhua*) và cá (*Melanogrammus aeglefinus*) cho thấy khả năng thụ tinh và hoạt lực tinh trùng được gia tăng (DeGraaf and Berlinsky, 2004). Đối với cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar*), bổ sung hàm lượng kháng sinh cao hơn (125 IU/ml Penicillin + 125 µg/ml Streptomycin) không gây độc đối với tinh trùng mà còn kéo dài được thời gian bảo quản lạnh (Stoss 1983). Thời gian bảo quản lạnh của tinh trùng cá tầm thìa Paddlefish (*Polyodon spathula*) cũng được gia tăng nếu sử dụng kết hợp kháng sinh Penicillin/ Streptomycin (Brown and Mims 1995). Theo báo cáo của Le et al. (2011), bảo quản lạnh tinh trùng cá đù vàng (*Larimichthys polyactis*) trong chất bảo quản là dịch tương nhân tạo ở tỉ lệ 1:3 và có bổ sung 600ppm Gentamycin hoặc 200ppm Neomycin có thể gia tăng thời gian hoạt lực tinh trùng đến ngày thứ 26. Năm 2013, cũng theo tác giả Le, bảo quản lạnh tinh trùng cá chêm mồm nhọn (*Psammoperca waigiensis*) trong dịch tương nhân tạo ở tỉ lệ 1:3 có bổ sung 200ppm Gentamycin có thể kéo dài thời gian hoạt lực cho đến ngày thứ

36. Đối với nghiên cứu này, hoạt lực tinh trùng và vận tốc tinh trùng cũng kéo dài thời gian hoạt lực cho đến ngày thứ 36 nếu bổ sung thêm 200ppm Neomycin.

5. KẾT LUẬN

Việc bổ sung kháng sinh trong bảo quản lạnh tinh trùng cá mú cộp trong tủ lạnh có tác dụng kéo dài thời gian tồn tại của tinh trùng. Kết quả thu được trong phạm vi nghiên cứu này là tinh trùng bảo quản trong dịch tương nhân tạo với tỉ lệ pha loãng 1:3 có bổ sung Neomycin ở liều lượng 200 ppm được bảo quản ở nhiệt độ 4oC có thể duy trì hoạt lực tinh trùng và vận tốc tinh trùng tốt, đạt 4,00% và 56,00 µm/s ở ngày thứ 36.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học trẻ Thụy Điển (IFS) trong dự án với mã số A/5165-1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Billard R., Cosson J., Noveiri S.B. and Pourkazemi M., (2004). Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture Asia*, 236: 1-9.
- Bobe J. and Labbe C. (2009). Chilled storage of sperm and eggs. *In: V. Robles E. Cabrita, P. Herráez editor (Eds.). Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species: CRC Press, Taylor Francis Group., p. 219-235.*
- Brown G.G. and Mims S.D. (1995). Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. *Prog Fish Cult.*, 57(64).
- Chang Y.J., Chang Y.J., Lim H.K., Lee J.K. and Park Y.J. (2002). Cold storage of milt from four species of flatfish. *J. Fish. Sci. Tech.*, 5: 64-74.
- Chao N.H., Tsai H.P. and Liao I.C. (1992). Short- and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper *Epinephelus malabaricus*. *Asian Fish. Sci.*, 5: 103-116.
- DeGraaf J.D. and Berlinsky D.L. (2004). Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquaculture Asia*, 234(527).
- Đoàn Khắc Bộ (2008). Kỹ thuật nuôi cá mú, Nhà xuất bản Đà Nẵng.

- Hoàng Thị Hiền và Lê Minh Hoàng (2014). Đặc tính tinh trùng cá mú cạp. Tạp chí sông Cửu Long, 3(23-32).
- Igor B., Oddvar O., Geir R. and Steinar J. (2006). Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. In: Optimizing the protocol. Theriogenology, 66.
- Lê Anh Tuấn (2004). Tình hình nuôi cá mú ở Việt Nam: Hiện trạng và các trở ngại về mặt kỹ thuật. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, Số đặc biệt: 174-179.
- Le M.H., Han K.L., Byung H.M., Park M.S. and Chang Y.J. (2011). Storage of Yellow Croaker *Larimichthys polyactis* Semen. The Israeli Journal of Aquaculture, Bamidgeh, 63.
- Le M.H., Nguyen T.T.T. and Pham P.L. (2013). Role of antibiotics on chilled storage sperm motility of Waigieu seaperch *Psammoperca waigiensis*. Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh.
- Lê Minh Hoàng, Bông Minh Đương, Mai Như Thủy và Phạm Quốc Hùng (2013). Nghiên cứu bảo quản tinh trùng cá chẽm mỡ nhọn *Psammoperca waigiensis* trong tủ lạnh. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản.
- Lê Minh Hoàng, Hoàng Thị Hiền, Phạm Phương Linh và Phạm Quốc Hùng (2014). Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng, nhiệt độ, pH và áp suất thẩm thấu lên hoạt lực tinh trùng cá mú cạp *Epinephelus fuscoguttatus*. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản.
- Lim H.K., An C.M., Son M.H., Park M.W., Kim E.O. and Byun S.G. (2006). Effect of diluents and temperature on sperm storage in starry flounder *Platichthys stellatus*. J. Aquacult., 19: 47-51.
- Lim H.K., An C.M., Son M.H., Park M.W. and Park Y.J., (2005). Effect of diluents for cold storage of olive flounder *Paralichthys olivaceus* sperm. J. Kor. Fish. Soc., 38: 232-238.
- Segovia M., Jenkins J.A., Paniagus-Chavez C. and Tiersch T.R. (2000). Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. Theriogenology, 53: 1489-1499.
- Stoss J. (1983). Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: W. Hoar, D. Randall, and E. Donaldson (Eds.). Fish physiology: New York: Academic Press. p. 305-350.