

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC ĐỂ SẢN XUẤT VÀ SỬ DỤNG TRONG ƯƠNG CÁ TRA

Nguyễn Thành Tâm*, Dương Thị Bé Ba, Lê Văn Toàn, Nguyễn Văn Bá

Trường Đại học Tây Đô, *nttam@tdu.edu.vn

TÓM TẮT: Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tuyển chọn vi khuẩn lactic để nuôi cấy sản xuất sinh khối dùng trong ương cá tra giống. Kết quả tuyển chọn và định danh được *Enterococcus hirae* từ sản phẩm cá lên men có triển vọng. *E. hirae* được lên men sản xuất sinh khối theo kiểu bố trí thí nghiệm thừa số 3 nhân tố. Kết quả xác định được tỷ lệ tối ưu của 3 thành phần bổ sung, đó là sucroz 11%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,48% và KH_2PO_4 0,25% để lên men đạt sinh khối khô 0,85 g/l. Sinh khối khô bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ thường, mật độ đạt 10^8 CFU/g, cần phải hồi sinh trong nước ấm 40°C với tỷ lệ 1/10 trong 30 phút trước khi phun lên thức ăn Aquaxcel-40%N ở 3 mức khác nhau (NT1: 0 ml, NT2: 30 ml và NT3: 50 ml/kg thức ăn). Cá tra hương được nuôi 30 con trong lồng (0,5×0,5×1 m) trong 28 ngày. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của cá tra giống tăng 38% (76,6% ở NT3), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng (55,5% ở NT1). Khối lượng trung bình của cá tra giống cuối thí nghiệm tăng 13% (NT3), tăng 7,8% (NT2), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng. Như vậy, nên bổ sung sinh khối *E. hirae* vào thức ăn trong ương cá tra để làm tăng tỷ lệ sống và tăng trưởng đạt chuẩn cá tra giống.

Từ khóa: *Enterococcus hirae*, cá tra, tối ưu hóa, vi khuẩn lactic.

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lactic (VKL) đang được nghiên cứu phổ biến và được ứng dụng khá nhiều trong nuôi trồng thủy sản. Các giống vi khuẩn lactic đang được nghiên cứu và ứng dụng trong môi trường nước nuôi thủy sản hiện nay là *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*. Đã có một số công trình nghiên cứu ứng dụng VKL trong nuôi trồng thủy sản như khả năng kháng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* của VKL [4], nghiên cứu tuyển chọn VKL có sinh chất kháng khuẩn [3], xác định những tính chất có lợi của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* [1].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn vi khuẩn lactic

Vi khuẩn lactic được phân lập bằng môi trường MRS ở 37°C. Tuyển chọn khả năng sinh chất kháng sinh của VKL bằng phương pháp đục lỗ với vi khuẩn chỉ thị *Edwardsiella ictaluri*. Định danh VKL bằng phương pháp giải trình tự 16rARN qua sự liên kết giữa trường Đại học Tây Đô và Đại học Kasetsart, Thái Lan trong chương trình trọng điểm châu Á (ACP). Vi khuẩn được lên men chìm sản xuất sinh khối tối ưu theo kiểu bố trí thí nghiệm thừa số 3 nhân tố, 3 mức độ, 2 lần lặp lại, tổng cộng có 27 công thức X2=54 NT. Số liệu được phân

tích thống kê và vẽ đồ thị bằng phần mềm Statgraphic Plus. Sinh khối được sấy khô ở nhiệt độ thấp và bảo quản ở nhiệt độ thường trong thời gian 6 tháng. Trước khi bổ sung vào thức ăn, sinh khối khô được hồi sinh trong nước ấm 40°C trong 30 phút theo tỷ lệ 1 sinh khối khô/10 nước.

Nguồn cá tra

Cá tra giống có khối lượng từ 18-21g, cá tương đối đồng cỡ, khỏe mạnh, bơi lội linh hoạt, da sáng bóng. Cá tra được kiểm tra chất lượng giống theo tiêu chuẩn 28 TCN 133:1998 theo quyết định số 733/1998/QĐ-BTS.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 công thức trong 9 giai ương cá (vèo ương cá) với kích thước 100×50×100 cm, đặt các giai ương vào trong ao theo hàng ngang và cố định bằng cọc tre (mỗi công thức được lặp lại 3 lần (bảng 1).

Trong quá trình ương, cho cá ăn thức ăn dạng viên (thức ăn Aquaxcel) có hàm lượng đạm là 40%, chất béo 6%. Lượng thức ăn cho cá ăn bằng 10% khối lượng cơ thể/ngày.

Chỉ tiêu theo dõi là tăng trưởng khối lượng và tỷ lệ sống của cá (%).

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm ương cá

Công thức	Lặp lại (lần)	Mật độ (cá/giai)	Lượng <i>E. hirae</i> bổ sung (ml)/Kg thức ăn
1	3	30	0
2	3	30	30
3	3	30	50

Phương pháp thu mẫu

Cá được thu mẫu sau khi kết thúc thí nghiệm để xác định chỉ tiêu tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá theo phương pháp của Pravdin, (1973) [2].

Phân tích số liệu

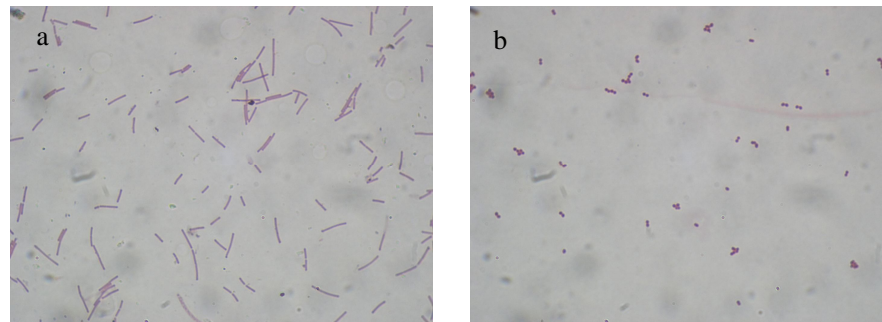
Số liệu được ghi nhận và xử lý bằng phần mềm Microsoft office Excel 2003. Tính toán giá trị trung bình (Mean), độ lệch chuẩn (Standard deviation) bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

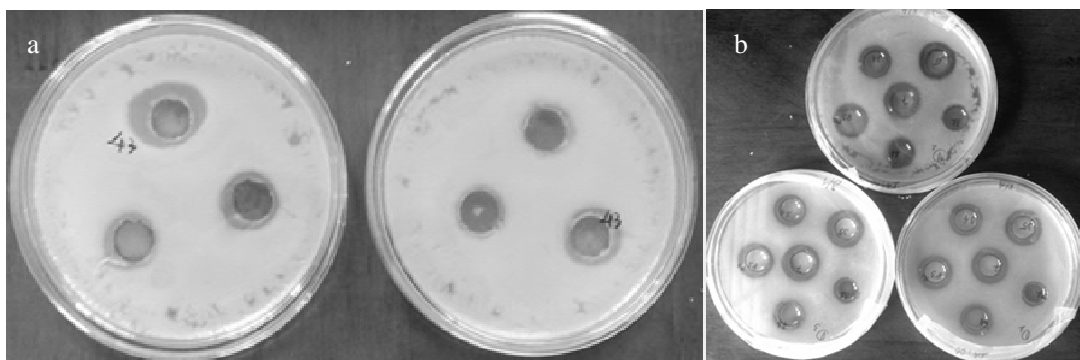
Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic

Có tổng cộng 54 dòng VKL được phân lập từ 50 mẫu cá, tôm, mắm và nước mắm. Tất cả các dòng VKL đều gram âm, catalase và oxidase âm tính, hình que ngắn hoặc dài 46 dòng, hình cầu 8 dòng (hình 1).

Kết quả tuyển chọn cho thấy, có 39 dòng VKL có vòng kháng khuẩn kháng lại vi khuẩn gây bệnh gan thận mù *Edwardsiella ictaluri*, trong đó, có 13 dòng có vòng kháng khuẩn từ 2,17-3,33 mm (kháng mạnh) (hình 2).



Hình 1. Hình thái vi khuẩn lactic gram (-): a. hình que dài; b. hình cầu đôi



Hình 2. Hoạt tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic: a. Kháng trung bình; b. Kháng mạnh.

Định danh

Hai dòng VKL được phân lập từ mắm cá 1FF và 2FF có triển vọng được chạy PCR và

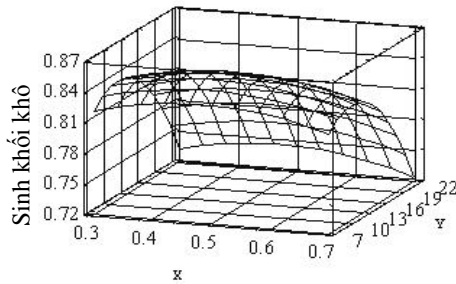
giải trình tự. Sản phẩm PCR cho vạch 2.500 cặp bazơ và khi so kết quả giải trình tự với dữ liệu GenBank ở vị trí AF061011, 2 dòng được định

đánh là *Enterococcus hirae* tương đồng 99 và 98% ở đầu đoạn môi 5', tương đồng 96 và 99% ở đầu đoạn môi 3'.

Lên men sản xuất chế phẩm

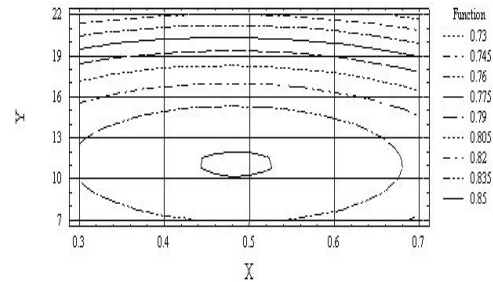
Kết quả lên men tối ưu của bố trí thí nghiệm thừa số 3 nhân tố trên cho thấy bổ sung 11%

sucroz, 0,48% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 0,25% KH_2PO_4 thu được sinh khối khô cao nhất 0,85 g/l cho bởi đồ thị mặt đáp ứng (response surface) (hình 3), đồ thị vòng đồng mức (contour) (hình 4) và kết quả giải phương trình hồi qui nhiều chiều từ các số liệu thu được của 27 công thức, lặp lại 2 lần.



Hình 3. Đồ thị mặt đáp ứng

X. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Y. sucroz, KH_2PO_4 cố định ở mức 0,25%



Hình 4. Đồ thị vòng đồng mức

Tăng trưởng của cá tra

Tốc độ tăng trưởng của cá ở 3 công thức được thể hiện ở bảng 2. Đây là những chỉ tiêu rất quan trọng để đánh giá kết quả của quá trình ương cá có hay không có bổ sung chế phẩm *E. hirae*. Khối lượng trung bình của cá (18,3±2,76 g) lúc bố trí thí nghiệm tương đồng với nhau. Khối lượng trung bình của cá sau thí nghiệm đạt cao nhất ở công thức 1 có bổ sung 50 ml (10^6 cfu/ml) *E. hirae* (39,0±7,83 g), kế đến là công thức 2 có bổ sung 30ml *E. hirae* (37,2±7,22 g), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) với công thức đối chứng (không bổ sung), thấp nhất (32,8±4,97 g).

Bảng 2 cho thấy, tăng trọng đạt cao nhất ở công thức bổ sung 50 ml *E. hirae* (20,7±4,02

g) tiếp đến là công thức bổ sung 30 ml *E. hirae* (18,8±0,64 g), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) ở công thức đối chứng (14,4±1,28 g). Tốc độ tăng trưởng tuyệt đối theo ngày cũng tương đồng với tăng trọng và khối lượng cá sau thí nghiệm. Ở lô thí nghiệm bổ sung 50 ml *E. hirae* cá có DWG cao nhất 0,69±0,13 (g/ngày), (0,63±0,02 g/ngày) ở công thức bổ sung 30 ml *E. hirae*, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với công thức đối chứng có DWG thấp nhất 0,48±0,04 (g/ngày). Cá ở công thức đối chứng có SGR thấp nhất (1,93±0,13%/ngày), cao nhất ở công thức bổ sung 50 ml *E. hirae* (2,51±0,35%/ngày) và khác biệt có ý nghĩa ($p<0,05$) giữa hai công thức này. Như vậy, khi bổ sung *E. hirae* đã làm tăng các chỉ tiêu tăng trưởng và khối lượng của cá tra giống.

Bảng 2. Tăng trưởng về khối lượng

CT	W_d (g)	W_c (g)	WG (g)	DWG (g/ngày)	SGR (%/ngày)
1	18,3±2,76 ^a	32,8±4,97 ^a	14,4±1,28 ^a	0,48±0,04 ^a	1,93±0,13 ^a
2	18,3±2,76 ^a	37,2±7,22 ^b	18,8±0,64 ^b	0,63±0,02 ^b	2,36±0,06 ^b
3	18,3±2,76 ^a	39,0±7,83 ^b	20,7±4,02 ^b	0,69±0,13 ^b	2,51±0,35 ^b

Giá trị thể hiện là số trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

Tỷ lệ sống của cá sau thời gian thí nghiệm

Tỷ lệ sống của cá là một chỉ tiêu quan trọng quyết định năng suất cá nuôi. Kết thúc thí

th nghiệm cho thấy tỷ lệ sống của cá giữa các công thức có sự khác nhau (bảng 3).

Các công thức sử dụng thức ăn có bổ sung

E. hirae cho tỷ lệ sống của cá cao hơn so với công thức đối chứng. Tỷ lệ sống trung bình của cá ($76,6 \pm 10\%$) đạt cao nhất ở công thức bổ sung 50ml *E. hirae*, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) với công thức đối chứng ($55,5 \pm 3,87\%$). Như vậy, bổ sung VKL *E. hirae* vào thức ăn đã làm tăng tỷ lệ sống cá tra giống.

Bảng 3. Tỷ lệ sống của cá tra

NT	Tỷ lệ sống (%)
1	$55,5 \pm 3,87^a$
2	$67,7 \pm 5,1^a$
3	$76,6 \pm 10^b$

Giá trị thể hiện là số trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trong cùng một cột có các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

KẾT LUẬN

Tỷ lệ sống trung bình của cá đạt cao nhất ($76,6 \pm 10\%$) và khối lượng trung bình của cá đạt cao nhất ($39,0 \pm 7,83$ g) ở công thức bổ sung 50 ml (10^6 cfu/ml) *E. hirae*/kg thức ăn.

E. hirae có thể được bổ sung vào thức ăn

nhằm nâng cao tỷ lệ sống và sự tăng trưởng của cá tra giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Diễm Hương, Đỗ Thị Bích Thủy, 2012. Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế. Tạp chí Khoa học, Đại học Huế, 71(2): 177-187.
2. Pravdin I. F., 1973. Hướng dẫn nghiên cứu cá. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. Nguyễn Thị Minh Giang dịch. 275 trang.
3. Nguyen Thanh Tam, Dang Thi Thu Thao, Sunee Nitisingprasert, Kenji Sonomoto, Nguyen Van Ba, 2010. Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fermented fish products in Vietnam. Journal of Kasetsart University, 1: 255-158.
4. Nguyen Thanh Tam, Dang Thi Thu Thao, Nguyen Van Ba, 2011. Evaluated inhibition of *E. ictaluri* by lactic acid bacteria. Vietfish International, 4: 58-60.

THE SELECTION OF THE LACTIC ACID BACTERIA FOR BIOMASS PRODUCTION IN NURSING STRIPED CATFISH

Nguyen Thanh Tam, Duong Thi Be Ba, Le Van Toan, Nguyen Van Ba

Tay Do University

SUMMARY

The aim of this study is to select the lactic acid bacteria to produce biomass in nursing striped catfish. After isolation and antibiotic substrate testing, the genera *Enterococcus hirae* isolated from fermented fish product was the most promising. The 3 factorial experimental design was used for *E. hirae* biomass production. The results showed that the optimum dried biomass 0.85 g/l was obtained in supplements: sucrose 11%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.48% and KH_2PO_4 0.25%. The dried biomass was stored in 6 months at room temperature with the density of 10^8 CFU/g. The *E. hirae* in dried biomass was revived in warm water at 40°C , for 30 minutes. The randomized complete experimental design was used for nursing of 30 *Pangasianodon hypophthalmus* fingerlings by Aquaxcel-40N in 28 days, with or without *E. hirae* solution: 0 ml (control=treatment N^o1), 30 ml (treatment N^o2), 50 ml (treatment N^o3). The results showed that the survival ratio of *P. hypophthalmus* fingerlings increased 38% on N^o3 treatment, significant different in comparison with control, the average weight gain of *P. hypophthalmus* fingerlings was also increased 13% on N^o3 treatment and 7.8% on N^o2 treatment, significant different in comparison with control. In conclusion that, *E. hirae* supplementation for nursing of *Pangasianodon hypophthalmus* fingerlings in order to increase the survival ratio and weight gain.

Keywords: *Enterococcus hirae*, gain ratio, lactic bacteris, survival ratio.

Ngày nhận bài: 15-7-2013