

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN**



PHÙNG DIỆP LÀI

**NGHIÊN CỨU LÊN MEN CÁC CHỦNG VI SINH
PROBIOTICS VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHĂN NUÔI GÀ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

BUÔN MA THUỘT, NĂM 2011

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN**



PHÙNG DIỆP LÀI

**NGHIÊN CỨU LÊN MEN CÁC CHỦNG VI SINH
PROBIOTICS VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHĂN NUÔI GÀ**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 30

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Anh Dũng

BUÔN MA THUỘT, NĂM 2011

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ một công trình nào khác. Mọi sự giúp đỡ và các thông tin trích dẫn đã được nêu rõ nguồn gốc.

Người cam đoan

Phùng Diệp Lại

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn tốt nghiệp này, tôi xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến:

PGS.TS Nguyễn Anh Dũng, Giám đốc Trung tâm Công nghệ Sinh học, Trường Đại Học Tây Nguyên, người hướng dẫn khoa học trực tiếp đã tận tình hướng dẫn phương pháp nghiên cứu và đóng góp nhiều ý kiến quý báu, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Lãnh đạo Trường Đại Học Tây Nguyên, tập thể thầy cô giáo phòng Sau đại học, Khoa khoa học Tự nhiên&Công nghệ và Khoa Nông Lâm nghiệp.

Các bạn bè và người thân đã giúp đỡ, động viên tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu. Trân trọng cảm ơn.

Người thực hiện

Phùng Diệp Lại

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết	1
2. Mục tiêu của đề tài	2
3. Ý nghĩa khoa học	2
4. Ý nghĩa thực tiễn	2
5. Giới hạn đề tài	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về vi sinh vật probiotics	3
1.2. Thành phần của probiotics	3
1.2.1. <i>Bacillus subtilis</i>	4
1.2.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	5
1.2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.2.4. <i>Nitrosomonas</i> sp.	10
1.3. Tiêu chí chọn lựa vi sinh vật probiotics	11
1.4. Cơ chế tác động của probiotics	11
1.4.1. <i>Tác động kháng khuẩn</i>	11
1.4.2. <i>Tác động biểu mô ruột</i>	12
1.4.3. <i>Tác động miễn dịch</i>	12
1.4.4. <i>Tác động đến vi khuẩn đường ruột</i>	12
1.4.5. <i>Tác động tăng khả năng hấp thụ thức ăn</i>	12
1.5. Vai trò của probiotics	12
1.5.1. <i>Đối với vật nuôi</i>	12
1.5.2. <i>Đối với con người</i>	13
1.6. Một số lưu ý khi sử dụng probiotics	13
1.7. Yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của probiotics	13
1.8. Công nghệ lên men	14

1.8.1. <i>Giống vi sinh vật</i>	14
1.8.2. <i>Nhân giống vi sinh vật</i>	15
1.8.3. <i>Lên men</i>	16
1.9. Các dạng chế phẩm vi sinh vật (VSV)	18
1.9.1. <i>Chế phẩm nhân nuôi trên môi trường thạch bằng</i>	18
1.9.2. <i>Chế phẩm VSV dạng dịch thể</i>	18
1.9.3. <i>Chế phẩm VSV dạng khô</i>	19
1.9.4. <i>Chế phẩm VSV dạng đông khô</i>	19
1.9.5. <i>Chế phẩm dạng bột chất mang</i>	20
1.10. Tình hình nghiên cứu	24
1.10.1. <i>Trên thế giới</i>	24
1.10.2. <i>Trong nước</i>	26
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
2.1. Nội dung nghiên cứu	33
2.2. Phương pháp nghiên cứu	33
2.2.1. <i>Đối tượng và vật liệu</i>	33
2.2.2. <i>Phương pháp phân lập và bảo quản mẫu</i>	34
2.2.3. <i>Phương pháp phân tích định lượng vi sinh vật</i>	36
2.2.4. <i>Phương pháp nghiên cứu xây dựng quy trình nuôi cấy các chủng vi sinh probiotics</i>	38
2.2.5. <i>Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm probiotics trong chăn nuôi gà</i>	41
2.2.6. <i>Phương pháp xử lý thống kê</i>	41
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	42
3.1. Nghiên cứu mô tả đặc điểm sinh học của một số chủng vi sinh Probiotics	42
3.1.1. <i>Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi sinh probiotics</i>	42
3.1.2. <i>Đặc điểm sinh học của các chủng vi sinh probiotics</i>	43

3.1.3. <i>Mối tương quan giữa độ đục (chỉ số OD) và số lượng tế bào (CFU/ml)</i>	43
3.2. Nghiên cứu quy trình lên men các chủng vi sinh probiotics và tạo chế phẩm probiotics	47
3.2.1. <i>Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics</i>	47
3.2.2. <i>Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics</i>	53
3.2.3. <i>Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics</i> ...	55
3.2.4. <i>Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics</i>	57
3.2.5. <i>Ảnh hưởng của độ lắ đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics</i>	59
3.2.6. <i>Xây dựng qui trình tạo chế phẩm probiotics</i>	61
3.3. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến mật độ VSV của chế phẩm ..	63
3.4. Nghiên cứu hiệu quả của việc sử dụng chế phẩm probiotics trong chăn nuôi gà	64
3.4.1. <i>Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng</i>	65
3.4.2. <i>Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khối lượng trứng</i>	67
3.4.3. <i>Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khả năng kháng bệnh ở gà đẻ trứng</i>	69
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	73
TÀI LIỆU THAM KHẢO	75

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

- MRS	Demam Rogosa Sharpe
- ĐTQH	Đặc tính quang học
-MCN	Mặt cắt ngang
- MT	Môi trường
- <i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
- <i>L.acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
- <i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
- VSV	Vi sinh vật
- rpm	Rounds per minutes (vòng mỗi phút)
- TB	Trung bình

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Tình hình chăn nuôi gia cầm Đak Lak trong 10 năm (2000-2009).....	32
Bảng 2.1: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của <i>B.subtilis</i>	38
Bảng 2.2: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của <i>L.acidophilus</i>	38
Bảng 2.3: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của <i>S.cerevisiae</i>	39
Bảng 2.4: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của <i>Nitrosomonas</i> sp.....	39
Bảng 3.1: Hình thái khuẩn lạc của 4 chủng vi sinh vật.....	42
Bảng 3.2: Hình thái tế bào của 4 chủng vi sinh probiotics	43
Bảng 3.3: Chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) <i>B.subtilis</i>	43
Bảng 3.4: Chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) <i>L.acidophilus</i>	44
Bảng 3.5: Chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) <i>S.cerevisiae</i>	45
Bảng 3.6: Chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) <i>Nitrosomonas</i> sp. ...	46
Bảng 3.7: Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sinh trưởng của <i>B. subtilis</i>	48
Bảng 3.8: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng <i>L.acidophilus</i>	49
Bảng 3.9: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của <i>S.cerevisiae</i>	50
Bảng 3.10: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của <i>Nitrosomonas</i> sp.....	52
Bảng 3.11: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng.....	54

Bảng 3.12: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các chủng.....	56
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng	58
Bảng 3.14: Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng của các chủng...	59
Bảng 3.15: Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến sinh trưởng của các chủng.....	63
Bảng 3.16: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng.....	66
Bảng 3.17: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khối lượng trứng	67
Bảng 3.18: Số con gà bị nhiễm bệnh TB trong ô theo ngày.....	70

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ

Đồ thị 3.1: Đường tương quan tuyến tính giữa A(CFU/ml) và OD625nm của <i>B.subtilis</i>	44
Đồ thị 3.2: Đường tương quan tuyến tính giữa A(CFU/ml) và OD600nm của <i>L.acidophilus</i>	45
Đồ thị 3.3: Đường tương quan tuyến tính giữa A(CFU/ml) và OD610nm của <i>S.cerevisiae</i>	46
Đồ thị 3.4: Đường tương quan tuyến tính giữa A(CFU/ml) và OD625nm của <i>Nitrosomonas</i> sp.	47
Biểu đồ 3.1: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của <i>B.subtilis</i>	48
Biểu đồ 3.2: Ảnh hưởng của MT nuôi cấy đến sinh trưởng của <i>L.acidophilus</i> ..	50
Biểu đồ 3.3: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của <i>S.cerevisiae</i> ..	51
Biểu đồ 3.4: Ảnh hưởng của MT nuôi cấy đến sinh trưởng của <i>Nitrosomonas</i> sp.....	52
Đồ thị 3.5: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng....	54
Biểu đồ 3.5: Ảnh hưởng của pH đến các chủng	57
Biểu đồ 3.6: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến các chủng	58
Biểu đồ 3.7: Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng của các chủng.....	60
Biểu đồ 3.8: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng	66
Biểu đồ 3.9: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khối lượng trứng ...	68
Biểu đồ 3.10: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khả năng kháng bệnh của gà đẻ trứng	70

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

"Probiotics là các vi sinh vật sống khi đưa một lượng cần thiết vào cơ thể đem lại hiệu quả có lợi cho cơ thể". Các vi khuẩn sống được phân lập từ các chủng vi khuẩn có lợi cho cơ thể; các chủng này qua thực nghiệm chứng minh được tác dụng có lợi cho cơ thể, không gây bệnh, có khả năng tồn tại khi qua dạ dày tới ruột không bị tiêu diệt bởi acid dạ dày và khi lưu giữ phải có khả năng tồn tại thời gian dài.

Lợi ích của vi sinh probiotics là: Đối kháng với mầm bệnh probiotics kích thích tăng số lượng hồng cầu, đại thực bào, tế bào lympho và đặc tính của vi khuẩn là tiết acid, H_2O_2 , lysozyme...[32]; tác động lên promoter trong quá trình tăng trưởng của động vật bởi các chất như biotin và vitamin B12[60]; tăng quá trình hấp thu dinh dưỡng; ức chế vi sinh vật gây bệnh [61]; tăng cường hệ thống miễn dịch [16]; cân bằng khu hệ vi sinh vật cho đường ruột; vi sinh probiotics không mang mầm bệnh và chất độc hại [23].

Ngày nay, khuynh hướng sử dụng liệu pháp thay thế cho liệu pháp kháng sinh dùng trong điều trị bệnh ngày càng được chú trọng và phát triển, nhất là những bệnh do vi sinh vật gây ra. Có thể nói, liệu pháp dùng probiotics được xem là liệu pháp thay thế khắc phục được những nhược điểm của liệu pháp dùng kháng sinh mà gây nhiều phản ứng phụ, chi phí lại cao và tình trạng kháng kháng sinh của vi sinh vật gây bệnh.

Ngành chăn nuôi Việt Nam đang trong quá trình phát triển theo xu hướng công nghiệp và chuyên môn hóa, góp phần rất lớn vào tổng sản phẩm nông nghiệp và là một bộ phận không thể thiếu trong nền kinh tế quốc dân. Chăn nuôi cung cấp thịt, sữa, trứng và các sản phẩm khác cho con người.

Việt Nam vừa trải qua cơn đại dịch gia cầm, nó không những gây thiệt hại nặng nề về kinh tế cho nhiều hộ nông dân và các trang trại chăn nuôi gia

cầm qui mô lớn, mà còn đe dọa các trung tâm giống gia cầm. Theo Trung tâm Khuyến nông Quốc gia cho biết, tổng đàn gia cầm cả nước hiện nay chỉ hồi phục được 70% so với trước dịch (khoảng 100 triệu con, riêng đàn gia cầm giống chỉ mới phục hồi 60%).

Với nhiều lý do trên đề xuất đề tài: **“Nghiên cứu lên men các chủng vi sinh probiotics và ứng dụng trong chăn nuôi gà”**.

2. Mục tiêu của đề tài

- Xây dựng quy trình nuôi cấy nhân giống các chủng vi sinh probiotics để ứng dụng trong chăn nuôi gà.

- Đánh giá hiệu quả của chế phẩm probiotics trong chăn nuôi gà để trứng.

3. Ý nghĩa khoa học

Kết quả nghiên cứu của đề tài góp phần làm sáng tỏ vai trò của việc sử dụng các chủng vi sinh probiotics.

4. Ý nghĩa thực tiễn

Ứng dụng chế phẩm probiotics trong ngành chăn nuôi giảm chi phí đầu tư và thời gian chăm sóc, góp phần cải thiện đời sống của nông dân.

5. Giới hạn đề tài

Trong quá trình thực hiện, do thời gian, trang thiết bị có hạn nên chỉ tiến hành theo dõi một số đối tượng vi sinh vật có lợi và các chỉ tiêu cơ bản.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về vi sinh vật probiotics

Từ “probiotics” có nguồn gốc từ Hy Lạp có nghĩa là “cho cuộc sống”. Tuy nhiên, định nghĩa về probiotics đã phát triển nhiều theo thời gian. Lily và Stillwell (1965) đã mô tả trước tiên probiotics như hỗn hợp được tạo thành bởi một động vật nguyên sinh mà thúc đẩy sự phát triển của đối tượng khác. Phạm vi của định nghĩa này được mở rộng hơn bởi Sperti vào đầu những năm bảy mươi bao gồm dịch chiết tế bào thúc đẩy phát triển của vi sinh vật (Gomes và Malcata, 2007)[40]. Parker (1974) đã áp dụng khái niệm này đối với phần thức ăn gia súc có một ảnh hưởng tốt đối với cơ thể vật chủ bằng việc góp phần vào cân bằng hệ vi sinh vật trong ruột của nó. Vì vậy, khái niệm “probiotics” được ứng dụng để mô tả là các vi sinh vật sống góp phần vào cân bằng hệ vi sinh vật ruột” [51].

Định nghĩa chung này sau đó được làm cho chính xác hơn bởi Fuller (1989), ông định nghĩa probiotics chứa vi sinh vật sống hỗ trợ thức ăn ảnh hưởng có lợi đến vật chủ bằng việc cải thiện cân bằng hệ vi sinh vật ruột của nó[22]. Khái niệm này sau đó được phát triển xa hơn: “vi sinh vật sống (vi khuẩn lactic và vi khuẩn khác, hoặc nấm men ở trạng thái khô hay bổ sung trong thực phẩm lên men) mà thể hiện một ảnh hưởng có lợi đối với sức khỏe của vật chủ sau khi được tiêu hóa nhờ cải thiện tính chất hệ vi sinh vật vốn có của vật chủ” (Havenaar và Huis in't Veld, 1994)[36].

1.2. Thành phần của probiotics

Thành phần của probiotics thông dụng nhất là các vi khuẩn sinh acid lactic. Số chủng vi sinh vật trong một chế phẩm có thể nhiều ít khác nhau, các chủng cũng có thể cùng loài hoặc khác loài.

Probiotics bao gồm những vi khuẩn có lợi (vi sinh vật hữu ích) như vi khuẩn lactic acid (*L.acidophilus*, *L.casei*, *L.rhamnosus*, *L.bulgaricus*,

Carnobacterium...), giống *Bacillus* (*B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B. megaterium*, *B.polymyxa*,...), *Actinomycetes*, *Nitrobacteria*... được áp dụng để hạn chế sự nhiễm bệnh đối với các vi khuẩn gây bệnh. Một số thành phần khác cũng được tìm thấy trong probiotics là tập hợp các enzyme có nguồn gốc vi sinh vật như amylase, protease, lipase, cellulase, chitinase, một số vitamin thiết yếu và chất khoáng [14].

Người ta cũng dùng bào tử của vi khuẩn như một probiotics, thường sử dụng là *Bacillus*, *Lactobacillus*, nấm men, *Biridobacterium*, *Streptococcus*, ít thông dụng là một chủng đặc biệt của *Clostridium butyricum*. Chế phẩm có tính chất probiotics gồm những vi sinh vật sống như các vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Nitrosomonas*... người ta thường trộn vào thức ăn hoặc nước uống.

1.2.1. *Bacillus subtilis*

1.2.1.1. Đặc điểm sinh học

Bacillus subtilis là trực khuẩn gram dương, sinh bào tử, chiều ngang của bào tử không vượt quá chiều ngang của tế bào vi khuẩn, kích thước 0,5-2,5×1,2-10,0 μm, sắp xếp thành cặp hoặc chuỗi; do đó khi có bào tử vi khuẩn không thay đổi hình dạng, bào tử của vi khuẩn này có sức sống rất lâu.

Trực khuẩn có ở mọi nơi trong tự nhiên và khi điều kiện sống gay go, chúng có khả năng tạo ra bào tử gần như hình cầu, để tồn tại trong trạng thái "ngủ đông" trong thời gian dài. Loại sinh vật này có cực kỳ nhiều loài khác nhau, trong đó đa số là vô hại.

Bacillus subtilis dương tính với catalase, sử dụng khí oxy làm chất nhận electron khi trao đổi khí trong quá trình trao đổi chất. Qua kính hiển vi *Bacillus subtilis* đơn lẻ có hình dạng giống những chiếc que, phần lớn những chiếc que này có bào tử trong hình oval có khuynh hướng phình ra ở một đầu. Thường thì người ta quan sát thấy tập đoàn của giống sinh vật này rất rộng lớn, có hình dạng bất định và đang phát triển lan rộng.

1.2.1.2. Đặc điểm sinh lý

Giống *Bacillus* có hình thức sinh sản là nhân đôi: từ một tế bào mẹ sẽ hình thành hai tế bào con.

Trong số các loại vi khuẩn thì *Bacillus subtilis* có khả năng sinh bào tử khi gặp môi trường không thuận lợi cho sự sinh trưởng của chúng.

Bacillus subtilis là vi khuẩn đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh đường ruột ở người và gia súc để phòng chống bệnh tiêu chảy (Madigan, 2001)[39].

1.2.2. *Lactobacillus acidophilus*

L.acidophilus là một chi lớn với trên 50 loài thuộc họ vi khuẩn *Lactobacillaceae*. Trục khuẩn hình thái đa dạng từ dài đến dạng cầu trực khuẩn ngắn, kích thước 0,5-1,2×1,0-10,0 μm. Thường xếp chuỗi, đặc biệt ở giai đoạn sau của pha logarit của sự phát triển thường không di động. Gram dương, âm tính với catalase, không tạo bào tử, nhu cầu dinh dưỡng cao, ưa acid và sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men cacbon là acid lactic, môi trường acid ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật có hại.

L.acidophilus là vi sinh vật kỵ khí không bắt buộc. Do đó, trong thực tế khi nồng độ oxy thấp thì hoạt động sống được duy trì bình thường.

Nhu cầu dinh dưỡng phức tạp đòi hỏi aminoacid, peptid, các dẫn xuất của acid nucleic, các vitamin, muối, acid béo, các ester của acid béo và có thể lên men các loại cacbon.

Phát triển thuận lợi trên bề mặt thạch trong điều kiện kỵ khí và 5-10% CO₂. Khuẩn lạc trên môi trường thạch có kích thước 2-5 mm, một khối lồi, đục và không sắc tố. Khoảng nhiệt độ từ 5-53°C, tối ưu ở 30-40°C. Chịu được môi trường acid, pH tối ưu thường 5,5-5,8 hoặc thấp hơn.

L.acidophilus có vai trò quan trọng trong sự lên men của nhiều loại thực phẩm, từ sản phẩm sữa và sữa lên men, ngũ cốc, các sản phẩm thịt, nước, nước thải, bia, gạo, trái cây và nước trái cây, rau củ lên men, cám và bột nhào

chua. Lên men xảy ra khi vi khuẩn vào dung dịch đường và cacbonhydrat để sản xuất rượu, CO₂ và acid lactic.

Có nhiều sản phẩm sữa lên men mà sử dụng *L.acidophilus*. *L.acidophilus* và các vi khuẩn acid lactic được thêm vào sữa để làm giảm pH. Khi sữa trở thành acid, protein trong sữa và coagulate để tạo thành gel.

Tiềm năng của *L.acidophilus* là hoạt động như một kháng sinh để chống bệnh nhiễm trùng. *L.acidophilus* còn kí sinh trong miệng, đường tiêu hóa và âm đạo của nhiều loài động vật đẳng nhiệt trong đó có người. Với tư cách là một probiotic, nó có thể được sử dụng để ngăn chặn và xử lý chống biotic tiêu chảy, nhiễm khuẩn và men tiêu hóa nhiễm trùng. Mặt khác nó có thể giúp cơ thể được bảo vệ chống lại bệnh ung thư và ảnh hưởng của các trị liệu bằng hóa chất... Hơn nữa, chúng có thể được dùng như là một phòng chống ngộ độc thức ăn khi đi du lịch.

Việc phân loại vi khuẩn lactic vào các chi khác nhau phần lớn dựa trên hình thái học, quá trình lên men cacbonhydrat, ảnh hưởng của nhiệt độ, nồng độ muối, nồng độ acid hoặc kiềm, cấu hình của acid lactic, thành phần của acid béo và các thành phần của thành tế bào.

Có hai con đường lên men: Glycolysis thì acid lactic là sản phẩm cuối cùng, 6-phosphogluconate/phosphoketolase thì ngoài acid lactic còn có ethanol, acetate và CO₂.

Vi khuẩn lactic mang nhiều những đặc tính có lợi cho người và vật nuôi: hỗ trợ tiêu hoá, tăng cường khả năng miễn dịch, kích thích sự phát triển của vật nuôi... Ngoài ra chúng còn giúp điều trị các bệnh về đường tiêu hoá như: tiêu chảy, táo bón, loạn khuẩn... Bên cạnh đó, vi khuẩn lactic còn có khả năng kìm hãm, ức chế các vi sinh vật gây bệnh: *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*...do chúng sinh các chất: bacteriocin, acid lactic,... giúp cân bằng khu hệ vi sinh vật.[60]

1.2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.3.1. Đặc điểm sinh học

“Nấm men (Yeast, Levure) là loại nấm đơn bào, sinh sản bằng phương thức nảy chồi hoặc tự phân đôi tế bào”.

Nấm men phân bố rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong các môi trường có chứa đường, có pH thấp, chẳng hạn như trong hoa quả, rau dưa, mật mía, ri đường, mật ong... Nấm men *S.cerevisiae* được biết đến như một quần thể tế bào sống được con người nuôi cấy từ cổ xưa nhất.

Nấm men thuộc giống *S.cerevisiae* có các đặc điểm sau: sinh sản dinh dưỡng bằng nảy chồi ở nhiều phía; không tạo bào tử bắn; tế bào tử, nang bào tử hình thoi, mỗi nang chứa trên 2 bào tử, nang bào tử hình cầu hoặc hình trứng, nang chín khó vỡ; lên men glucose mạnh mẽ; không tạo thành váng sớm trên nước chiết mạch nha.

1.2.3.2. Đặc điểm hình thái và kích thước tế bào

Nấm men *S.cerevisiae* thường có cấu tạo đơn bào, có nhân thật, hình tròn, hình trứng hay bầu dục, hình dài hoặc elip.

Hình dạng của nấm men hầu như không ổn định. Nó phụ thuộc vào tuổi của nấm men và điều kiện nuôi cấy. *S.cerevisiae* có hình bầu dục nếu nó ở điều kiện giàu chất dinh dưỡng; trong điều kiện yếm khí nấm men có hình tròn, ngược lại trong điều kiện hiếu khí tế bào kéo dài hơn.

Kích thước tế bào thay đổi tùy thuộc giống, loài, chủng.

Tế bào nấm men thường có kích thước lớn gấp từ 5 đến 10 lần tế bào vi khuẩn. Kích thước trung bình của tế bào nấm men như sau: chiều dài: 9-10 μ m, chiều rộng: 2-7 μ m. Ngoài ra kích thước tế bào nấm men thay đổi theo điều kiện nuôi cấy, theo tuổi sinh lý.

1.2.3.3. Cấu tạo tế bào

Tế bào nấm men cũng như nhiều loại tế bào khác được cấu tạo chủ yếu từ các thành phần cơ bản sau: thành tế bào, màng nguyên sinh chất, nhân và các cơ quan khác.

1.2.3.4. Sự sinh sản của nấm men

Nấm men *S.cerevisiae* có 2 phương thức sinh sản đó là sinh sản vô tính bằng cách nảy chồi và sinh sản hữu tính bằng bào tử túi.

1.2.3.4.1. Sinh sản vô tính bằng cách nảy chồi

Nảy chồi là phương thức sinh sản chủ yếu của nấm men. Ở điều kiện thuận lợi nấm men sinh sôi nảy nở nhanh. Đối với các giống nấm men phát triển mạnh, có thể quan sát thấy tất cả tế bào đều có chồi, do sự tạo chồi hầu như chiếm toàn bộ chu kỳ sống của tế bào nấm men. Thực tế cả tế bào mẹ và tế bào con đều có thể tạo chồi mới trước khi chúng phân chia. Đối với các giống nấm men phát triển chậm hơn, thì các tế bào hầu như không hình thành chồi và sự tạo chồi chỉ chiếm một phần rất nhỏ trong chu kỳ của tế bào. Chu kỳ này là chu kỳ phát triển của nấm men đó là thời gian cần thiết kể từ lúc chồi mới hình thành tới lúc tế bào này phát triển và bắt đầu tạo tế bào mới.

Quá trình nảy chồi xảy ra đồng thời với sự bắt đầu của giai đoạn tổng hợp DNA. Những bước đầu tiên của quá trình hình thành chồi có liên quan đến hiện tượng mềm hoá của lớp thành tế bào dưới tác dụng của các enzyme lytic. Enzyme này tấn công vào các polysaccharide của thành tế bào làm cho chồi chui ra khỏi tế bào mẹ. Vật chất mới được tổng hợp sẽ được huy động đến chồi và làm cho chồi phình to dần lên. Kích thước của chồi tăng dần lên đến khi chồi đạt kích thước lớn nhất thì một vách ngăn có cấu tạo phức tạp được hình thành tại phần cổ của chồi, vách ngăn này trong thành phần có chứa chitin, mannan và glucan. Quá trình phân tách chỉ hoàn thành khi các lớp vách ngăn này tách ra và nó để lại trên tế bào mẹ vết sẹo chồi và trên tế bào con vết sẹo sinh.

Mỗi khu vực trên thành tế bào chỉ tạo được duy nhất một chồi non. Mỗi khi có tế bào mới được tách ra thì một sẹo chồi mới lại được hình thành trên tế bào mẹ và do đó bằng cách đếm sẹo chồi chúng ta có thể xác định được số lượng chồi đã được sinh ra trên mỗi tế bào riêng biệt. Bằng cách này chúng ta có thể xác định được độ trưởng thành của tế bào.

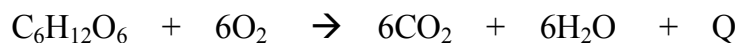
1.2.3.4.2. Sinh sản hữu tính

Bào tử túi của *S.cerevisiae* thường có hình dạng khác nhau có thể là hình cầu, hình bầu dục, vỏ nhẵn không màu. *S.cerevisiae* sinh sản đơn tính tạo thành bào tử từ tế bào riêng lẻ không thông qua tiếp hợp, bào tử này khi gặp điều kiện thích hợp sẽ phát triển thành tế bào mới. Tế bào này lại tiếp tục nảy chồi.

Đầu tiên từng cặp bào tử đơn bội kết hợp ngay trong túi xảy ra sự phối hợp tế bào chất và nhân, tế bào lưỡng bội sinh ra sẽ nảy mầm và chui qua màng túi. Tế bào này lại sinh sản theo cách nảy chồi. Sau đó nhân bên trong tế bào phân cắt giảm nhiễm. Tế bào biến thành túi chứa bốn bào tử túi, và cứ sinh sản như vậy. Ở *S. cerevisiae* tế bào dinh dưỡng đơn bội sinh sản theo cách nảy chồi. Sau đó 2 tế bào kết hợp với nhau xảy ra quá trình giao chất và giao nhân tạo thành tế bào dinh dưỡng lưỡng bội. Tế bào nảy chồi và sinh ra tế bào lưỡng bội khác và sau đó chuyển thành bào tử túi. Nhân phân cắt giảm nhiễm và sinh ra bốn bào tử túi rồi chuyển thành tế bào dinh dưỡng và tiếp tục sinh sản bằng cách nảy chồi.

1.2.3.5. Tính chất sinh lý, sinh hoá

Nấm men là ví dụ điển hình của vi sinh vật hiếu khí tùy tiện. Trong điều kiện đủ oxy, nấm men sẽ phát triển tăng sinh khối là chủ yếu, còn rượu không trực tiếp tạo thành hoặc tạo thành rất ít. Phương trình xảy ra trong hô hấp hiếu khí:



Quá trình hô hấp hiếu khí trải qua quá trình phosphoryl hoá và tiếp tục đi vào chu trình Krebs. Ở đây oxy phân tử được sử dụng như một chất nhận electron cuối cùng và glucose bị oxy hoá hoàn toàn thành nước và CO₂.

Ngược lại khi thiếu oxy quá trình hô hấp yếm khí xảy ra và hoạt động lên men là chủ yếu. Nấm men không có khả năng chịu được môi trường có độ acid cao nên acid pyruvic sinh ra sau con đường đường phân ngay lập tức chuyển đổi thành CO₂ và acetaldehyde và cuối cùng thành rượu etylic.



Dựa vào đặc điểm trên và mục đích thu nhận sản phẩm mà có thể điều khiển quá trình trao đổi chất của nấm men.[1]

Vách tế bào chứa mannan và glucan có tác dụng hoạt hóa đại thực bào, do đó giúp tăng cường miễn dịch. Hấp phụ độc tố và bài thải ra ngoài. Sản xuất enzyme tiêu hóa và các acid hữu cơ đưa pH ruột xuống 4-5.

Với cấu tạo của thành tế bào nấm men là β -1,3-glucan có thể chống một số bệnh khi chúng được bổ sung và có vai trò như vaccine. Chúng hoạt động như đại thực bào.[26]

1.2.4. *Nitrosomonas* sp.

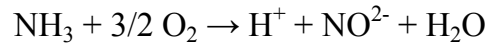
Nitrosomonas không sinh bào tử, tế bào nhỏ bé hình bầu dục, kích thước khoảng 0,5-1,5 μ m, hiếu khí; được tìm thấy trong đất, nước thải và các khu vực bị ô nhiễm có nồng độ các hợp chất chứa nitơ cao; có khả năng chuyển động và có tiên mao dài ở cực.

pH tối ưu của *Nitrosomonas* là 6,0-9,0 và nhiệt độ là 30°C.

Trên môi trường lỏng, *Nitrosomonas* trải qua một số pha, phát triển tùy thuộc điều kiện. Hai pha chủ yếu là pha di động - tế bào có một hay chùm tiên mao và pha tập đoàn khuẩn keo - các tế bào không di động.

Nguồn cacbon duy nhất trong môi trường là CO₂ có trong không khí và trong thành phần của CaCO₃. Nguyên liệu năng lượng và nguồn nitơ cho vi

khuẩn giai đoạn đầu là quá trình nitrate hoá NH_3 và muối amôn, giai đoạn hai là nitrite.



Vi khuẩn nitrate hóa không sử dụng các chất hữu cơ và chuyển hóa một cách chặt chẽ đối với việc oxy hóa cơ chất NH_3 thành nitrite. Chúng có vai trò quan trọng trong xử lý chất thải, nước thải công nghiệp và trong quá trình xử lý sinh học.

1.3. Tiêu chí chọn lựa vi sinh vật probiotics

- Có khả năng bám dính vào niêm mạc đường tiêu hóa của vật chủ.
- Không sinh chất độc, không gây bệnh cho vật chủ.
- Sinh các enzyme hoặc các sản phẩm cuối cùng mà vật chủ có thể sử dụng được.
- Dễ nuôi cấy, có khả năng tồn tại độc lập trong một thời gian dài.
- Chứa số lượng lớn các tế bào sống.
- Chịu được pH thấp ở dạ dày và muối mật ở ruột non.
- Có khả năng sống khi được đóng gói và đưa vào sử dụng.
- Có mùi vị chấp nhận được khi sử dụng.
- Khi sử dụng cần chú ý đến nhiệt độ.

1.4. Cơ chế tác động của probiotics

1.4.1. Tác động kháng khuẩn

Làm giảm số lượng vi khuẩn gây bệnh để ngăn chặn các mầm bệnh bằng nhiều cơ chế khác nhau:

- Tiết ra các chất kháng khuẩn gồm các acid hữu cơ, H_2O_2 , bacterioxin... có khả năng ức chế vi khuẩn gram (+), gram (-).
- Cạnh tranh với các nguồn bệnh vị trí bám dính vào đường ruột.
- Cạnh tranh dinh dưỡng cần thiết cho sự sống sót của mầm bệnh.
- Tác động kháng độc tố.

1.4.2. Tác động biểu mô ruột

- Đẩy mạnh sự liên kết chặt của những tế bào biểu mô.
- Giảm việc kích thích bài tiết và những hậu quả do bị viêm của sự lây nhiễm vi khuẩn.
- Đẩy mạnh sự tạo ra các phân tử phòng vệ như chất nhầy.

1.4.3. Tác động miễn dịch

- Probiotics như là phương tiện phân phát các phân tử kháng viêm cho đường ruột.
- Đẩy mạnh sự báo hiệu cho tế bào chủ để làm giảm đáp ứng viêm.
- Tạo đáp ứng miễn dịch để làm giảm dị ứng.
- Kháng nguyên của probiotics kích thích tế bào niêm mạc ruột sản sinh kháng thể.

1.4.4. Tác động đến vi khuẩn đường ruột

- Probiotics giúp tạo sự cân bằng tạm thời của hệ sinh thái đường ruột. Điều này phụ thuộc vào công dụng và liều lượng của giống vi khuẩn.
- Vi sinh probiotics điều hòa hoạt động trao đổi chất của sinh vật đường ruột.

1.4.5. Tác động tăng khả năng hấp thụ thức ăn

Tăng lượng thức ăn ăn vào và khả năng tiêu hóa: chúng tham gia vào sự trao đổi chất dinh dưỡng như cacbon, protein, lipid và khoáng.

1.5. Vai trò của probiotics

1.5.1. Đối với vật nuôi

- Kích thích tiêu thụ triệt để nguồn thức ăn hơn và làm giảm bớt sự rối loạn tiêu hóa.
- Đẩy mạnh sự tổng hợp vitamin B.
- Bảo vệ chống lại *Escherichia coli*, *Salmonella* và sự lây nhiễm những vi khuẩn khác.
- Cải thiện sự dung nạp lactose.

- Cải thiện chức năng miễn dịch.
- Nâng cao khả năng hấp thụ thức ăn, làm giảm hệ số thức ăn, rút ngắn thời gian nuôi.
- Tăng tỉ lệ sống và tăng năng suất.
- Giảm chi phí sử dụng thuốc kháng sinh và hóa chất trong việc điều trị bệnh.
- Giúp ngăn chặn những chỗ loét trong hệ thống tiêu hóa.

1.5.2. Đối với con người

Tăng hiệu quả kinh tế và giảm thời gian lao động cho người chăn nuôi, giảm ô nhiễm môi trường.

1.6. Một số lưu ý khi sử dụng probiotics

- Không sử dụng cùng lúc với các loại hóa chất và kháng sinh.
- Nếu đã sử dụng kháng sinh thì sau khi ngưng sử dụng 3-5 ngày nên trộn vào thức ăn các loại probiotics hoặc các loại men vi sinh, luân phiên sử dụng 5 ngày, sau đó ngưng 5 ngày đối với loại chế phẩm trộn vào thức ăn.
- Cần lưu ý đến điều kiện bảo quản các probiotics ở các nơi cung cấp, tránh nơi có ánh nắng trực tiếp.
- Bên cạnh đó xem trong thành phần có chứa các nhóm vi sinh vật có lợi hay không, cần xem kỹ các công dụng và hướng dẫn sử dụng để tùy trường hợp cụ thể của chuồng trại gia cầm mà sử dụng đạt hiệu quả cao.

1.7. Yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của probiotics

- Tình trạng dinh dưỡng và sức khỏe của đối tượng sử dụng.
- Sự hiện diện của yếu tố gây stress.
- Sự khác biệt về di truyền, tuổi giữa các đối tượng sử dụng.
- Sức sống và tính ổn định của probiotics.
- Liều và số lần sử dụng.
- Tương tác với thuốc khác.[14]

1.8. Công nghệ lên men

1.8.1. Giống vi sinh vật

Muốn có sản phẩm tốt ngoài quy trình công nghệ thì khâu giống là quan trọng nhất, nó quyết định chất lượng sản phẩm và giá trị kinh tế của quy trình sản xuất.

- Tiêu chuẩn của giống: vi sinh vật tốt; có khả năng sinh tổng hợp tạo sinh khối với hiệu suất cao; có khả năng sử dụng các nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm như các phụ phẩm, các phế thải; trong quá trình lên men không tạo ra các sản phẩm phụ không mong muốn; ít mẫn cảm đối với sự tạp nhiễm do vi sinh vật khác; sản xuất sinh khối có thể tách dễ dàng ra khỏi môi trường dinh dưỡng.

Tuy nhiên trong quá trình sản xuất, các tiêu chuẩn trên không phải gắn liền với nhau. Các vi sinh vật thuộc nhóm Eukaryote có kích thước tế bào lớn thể hình sợi, do đó dễ dàng tách chúng ra khỏi môi trường dinh dưỡng bằng phương pháp lọc ly tâm thông thường. Nhưng ở chúng thường tồn tại một quy tắc chung là kích thước tế bào tỉ lệ nghịch với hoạt tính trao đổi chất.

- Các công việc chủ yếu của công tác giống trong sản xuất: kiểm tra độ thuần khiết của giống trong lên men; kiểm tra khả năng hồi biến của giống; hoạt hóa giống sau một thời gian sử dụng; giữ giống bằng phương pháp thích hợp có thể duy trì những hoạt tính ưu việt của chúng, chống thoái hóa, mất hoạt tính.

- Các phương pháp giữ giống:

Hiện nay thường sử dụng bốn phương pháp chính để giữ giống vi sinh vật đó là:

- Bảo quản trên môi trường thạch bằng, định kỳ kiểm tra cấy truyền

Giống vi sinh vật được giữ trên môi trường thạch nghiêng (đối với các giống vi sinh vật hiếu khí) hoặc trích sâu vào môi trường thạch (đối với vi sinh vật kỵ khí). Các ống giống được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 2-4°C.

Định kỳ kiểm tra cấy truyền giống, tùy từng giống vi sinh vật khác nhau mà định kỳ cấy truyền khác nhau, song giới hạn tối đa là 3 tháng.

- Giữ giống trong cát hoặc đất sét vô trùng

Do cấu trúc hóa lý cát và sét là những cơ chất tốt mang các tế bào vi sinh vật, chủ yếu là nhóm vi sinh vật có bào tử. Cách làm như sau: cát và sét được xử lý sạch, sàng lọc qua rây, xử lý pH đạt trung tính, sấy khô và khử trùng. Sau đó bằng thao tác vô trùng trộn bào tử và cơ chất cát hoặc sét trong các ống nghiệm. Dùng paraffin nóng chảy phết lên nút bông của ống nghiệm để giúp cho ống giống không bị ẩm trở lại. Ngoài cát và sét, người ta còn giữ giống trong hạt ngũ cốc hay trên silicagen.... Phương pháp bảo quản giống trên chủ yếu cho nấm mốc và xạ khuẩn.

- Giữ giống bằng phương pháp lạnh đông

Bằng phương pháp này dựa trên nguyên tắc ức chế sự phát triển của vi sinh vật, đưa chúng vào điều kiện lạnh sâu ở -25°C đến -70°C . Người ta trộn vi sinh vật với dung dịch bảo vệ hay còn gọi là dung dịch nhũ hóa như glycerin 15%, huyết thanh ngựa (loại không cho chất bảo quản), dung dịch glucose hoặc lactose 10%.... Việc làm lạnh được tiến hành một cách từ từ. Khi độ lạnh đạt -20°C , nếu tiếp tục làm lạnh thì tốc độ làm lạnh phải đạt 1-2 $^{\circ}\text{C}$ /phút. Phương pháp bảo quản này có ưu điểm là bảo quản được lâu.

- Giữ giống bằng phương pháp đông khô

Về nguyên tắc cũng giống như phương pháp đông lạnh nhưng khác ở chỗ là đưa chất bảo vệ vào như glutamate 3% hay lactose 1,2% + peptone 1,2% hay saccharose 8% + sữa 5% + gelatin 1,5%. Đây là phương pháp bảo quản tối ưu nhất hiện nay, có thể tới vài chục năm mới phải làm lại.

1.8.2. Nhân giống vi sinh vật

Mục đích của việc nhân giống là để tăng số lượng tế bào vi sinh vật. Trong quy trình lên men thì tùy chủng giống vi sinh vật khác nhau mà nhân

theo cơ chất và môi trường nhân khác nhau, thường có hai dạng giống: tế bào sinh dưỡng và bào tử.

- Trường hợp giống là tế bào sinh dưỡng: để thu được lượng tế bào sinh dưỡng, người ta chọn môi trường nhân sinh khối là môi trường đảm bảo cho vi sinh vật tồn tại thích hợp nhất, để với thời gian ngắn nhất cho sinh khối vi sinh vật lớn nhất, thường dùng môi trường dịch thể (nuôi cấy chìm).

- Trường hợp giống là bào tử: thông thường chọn môi trường đặc (nuôi cấy bán rắn như cám gạo, bột ngô, thóc,...).

Khi kết thúc mỗi khâu nhân giống cần kiểm tra ngay độ thuần của giống và mật độ tế bào vi sinh vật cần nhân.

1.8.3. Lên men

Là giai đoạn nuôi cấy vi sinh vật để chúng tạo sản phẩm hoặc sinh khối vi sinh vật.... Đây là khâu quyết định một quy trình lên men. Người ta thường sử dụng hai phương pháp lên men là lên men bề mặt và lên men chìm.

1.8.3.1. Lên men bề mặt

Lên men bề mặt là thực hiện nuôi cấy vi sinh vật trên bề mặt môi trường dịch thể hoặc bán rắn.

- Nuôi cấy trên bề mặt dịch thể (dùng cho nhóm vi sinh vật hiếu khí): tùy từng loại vi sinh vật mà chọn môi trường thích hợp. Khi cho môi trường vào thiết bị lên men phải đảm bảo có bề mặt thoáng, rộng. Nuôi cấy theo phương pháp này đơn giản nhưng đòi hỏi diện tích sử dụng lớn, khó tự động quy trình sản xuất nên hiện nay phương pháp này ít được sử dụng.

- Nuôi cấy bề mặt sử dụng môi trường bán rắn: có thể dùng vi sinh vật hiếu khí, hoặc bán hiếu khí, kỵ khí. Ở phương pháp lên men này nguyên liệu thường dùng là: hạt gạo, đậu tương, mảnh sắn, mảnh ngô, bã mía, rơm rạ,...

Các loại nguyên liệu chứa tinh bột trước khi sử dụng phải xử lý bằng cách nấu chín. Ngoài các nguyên liệu nói trên người ta phải bổ sung các chất

đinh dưỡng vào môi trường để đảm bảo dinh dưỡng của vi sinh vật trong quá trình nhân sinh khối (lên men).

Đối với vi sinh vật hiếu khí cần phải có quạt thổi khí vô trùng. Trong lên men bán rắn, ngoài yêu cầu về nguyên liệu thì độ ẩm rất cần thiết cho quá trình lên men, phải luôn luôn đảm bảo độ ẩm 60-75% (độ ẩm không khí 90-100%).

1.8.3.2. Lên men chìm

Áp dụng cho cả vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí. Khi lên men chìm, vi sinh vật được nuôi cấy ở môi trường dịch thể sẽ phát triển theo chiều đứng của cột môi trường.

► Để thực hiện quá trình lên men chìm cần thực hiện từng bước sau:

- Thực hiện quá trình khuấy đảo và sục khí.
- Theo dõi sự tạo bọt trong lên men và biện pháp phá bọt.
- Điều chỉnh pH của môi trường lên men.
- Theo dõi và điều chỉnh nhiệt độ của môi trường lên men.
- Tiếp thêm nguyên liệu và bổ sung các chất tiền thể.
- Trạng thái tế bào của chủng giống dùng trong quá trình lên men và độ tạp khuẩn.
- Kiểm tra sự tiêu hao năng lượng, sự tạo thành trong quá trình lên men.
- Điều cuối cùng cũng là quan trọng nhất đó là xác định thời gian của quá trình lên men.

► Thu hồi sản phẩm: khi quá trình lên men kết thúc người ta tiến hành thu hồi sản phẩm. Các sản phẩm của quá trình tổng hợp vi sinh vật thường được tích lũy ở trong tế bào hoặc trong dung dịch nuôi cấy [7].

1.9. Các dạng chế phẩm vi sinh vật (VSV)

1.9.1. Chế phẩm nhân nuôi trên môi trường thạch bằng

Loại chế phẩm này được sản xuất trong phòng thí nghiệm lớn, dùng môi trường dinh dưỡng của Fred (1932). Chế phẩm sau khi xuất xưởng thường được đựng trong các chai lọ thủy tinh.

Ưu điểm là: khuẩn lạc VSV thường nhìn thấy được, do đó có thể loại bỏ được ngay tạp khuẩn bằng một số hoá chất có sẵn trong phòng thí nghiệm mà không cần phải chuẩn bị các nguyên liệu đắt tiền.

Tuy nhiên loại chế phẩm VSV này có nhiều hạn chế đó là: số lượng VSV chuyên tính ít, thời gian bảo quản và sử dụng ngắn, vận chuyển xuống cơ sở sản xuất không thuận tiện do đựng trong các chai lọ thủy tinh dễ vỡ.

1.9.2. Chế phẩm VSV dạng dịch thể

Chế phẩm VSV dạng dịch thể được sản xuất trong phòng thí nghiệm hoặc trong nhà máy, xí nghiệp theo quy trình công nghệ lên men. Theo đó cần có hệ thống máy lắc lớn hoặc nồi lên men có hệ thống điều khiển tốc độ khí để tạo sinh khối lớn. Sau đó dịch VSV được đóng vào chai lọ hoặc bình nhựa.

Loại chế phẩm VSV này tiện lợi ở chỗ không cần phải pha hoặc trộn với nước mà có thể trộn luôn vào hạt giống. Cũng có thể ly tâm dịch vi sinh để cô đặc sinh khối qua đó hạ giá thành sản phẩm.

Tuy nhiên loại chế phẩm VSV này có những hạn chế đó là: Chế phẩm phải luôn bảo quản ở điều kiện lạnh vì vậy khá tốn kém và không thuận lợi cho việc vận chuyển. Chi phí sản xuất chế phẩm thường tương đối cao vì dụng cụ chứa đựng đắt tiền. Gần đây một số cơ quan nghiên cứu, triển khai (NifTAL-Hoa Kỳ, DOA – Thái Lan, ICRISAT - Ấn Độ...) đã nghiên cứu thành công công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật dạng lỏng, trong đó quá trình nhân sinh khối VSV được gắn liền với việc xử lý sao cho mật độ VSV sau khi lên men luôn đáp ứng yêu cầu của tiêu chuẩn quy định, nghĩa là đạt mức từ hàng trăm triệu đến hàng tỉ VSV trong 1 ml. Ngoài ra, người ta cũng

lợi dụng khả năng sinh bào tử, bào nang của một số VSV để sản xuất các chế phẩm VSV dạng lỏng, trong đó sau quá trình lên men một số hoá chất chuyên hoá tiềm sinh hoặc một số kỹ thuật bức chế oxy, điện thế oxy hoá khử hoặc điều kiện dinh dưỡng được áp dụng làm cho VSV chuyển từ dạng sinh dưỡng sang dạng tiềm sinh. Chế phẩm VSV dạng lỏng sản xuất theo công nghệ mới đã khắc phục được các nhược điểm của chế phẩm dịch thể kiểu cũ và đang được áp dụng rộng rãi tại nhiều nước như Mỹ, Nhật, Canada, Úc và Việt Nam.

1.9.3. Chế phẩm VSV dạng khô

Năm 1965 Scolt và Bumganer đã chế tạo được một loại chế phẩm dạng khô. Cách làm như sau: sinh khối VSV được cho vào bình sục khí để đuổi hết nước, sau đó li tâm để tách VSV chuyên tính ra khỏi cơ chất và cho hấp phụ vào chất mang là bột cao lanh, sau đó cho hấp thụ tiếp vào CaSO_4 hoặc NaSO_4 để thu được chế phẩm VSV dạng khô.

Loại chế phẩm VSV dạng khô có ưu điểm là cất trữ, vận chuyển rất tiện lợi, dễ dàng, chế phẩm không bị nhiễm tạp, sử dụng trong thời gian dài (> 1 năm).

Nhưng công nghệ sản xuất loại chế phẩm VSV này phức tạp, tốn kém, do đó hiệu quả kinh tế không cao.

1.9.4. Chế phẩm VSV dạng đông khô

Chế phẩm VSV dạng đông khô được sản xuất từ những năm 1940-1960 ở Mỹ, Úc, Nga. Để sản xuất loại chế phẩm này sau khi lên men, sinh khối VSV được đông khô lại ở nhiệt độ rất thấp ($-20\div -40^\circ\text{C}$).

Loại chế phẩm VSV này có nhiều ưu điểm như ít bị nhiễm tạp ngay cả khi ở nhiệt độ rất cao, độ sống sót của VSV chuyên tính rất cao.

Chế phẩm cũng có hạn chế, đó là tỉ lệ bám dính và độ sống sót của VSV rất thấp đồng thời sản xuất rất công phu và tốn kém.

1.9.5. Chế phẩm dạng bột chất mang

Hiện nay hầu hết các nước trên thế giới đều sản xuất loại chế phẩm VSV trên nền chất mang, trong đó sinh khối VSV được tẩm nhiễm vào chất mang là các hợp chất hữu cơ hoặc không hữu cơ tự nhiên hoặc tổng hợp có tác dụng là nơi trú ngụ và bảo vệ VSV chuyên tính trong chế phẩm từ khi sản xuất đến khi sử dụng. Chất mang cần có những đặc điểm sau:

- Khả năng hút nước cao: 150-200%.
- Hàm lượng cacbonhydrat hữu cơ cao, tốt nhất >60%.
- Không chứa các chất độc hại đối với VSV tuyển chọn.
- Hàm lượng muối khoáng không vượt quá 1%.
- Kích thước hạt phù hợp với đối tượng sử dụng.

Loại chất mang thường được sử dụng là bã mía, lõi ngô nghiền, vỏ trấu, vỏ cà phê, bột sắn, mùn cưa... làm chất mang cho chế phẩm VSV.

Loại chế phẩm trên nền chất mang có ưu điểm là: quy trình sản xuất đơn giản, dễ làm, không tốn kém nhiều dẫn đến giá thành hạ, nguyên liệu sẵn có trong tự nhiên, mật độ VSV chuyên tính trong chế phẩm cao, chuyên chở dễ, tiện sử dụng, độ bám dính của VSV trên đối tượng sử dụng cao. Tuy nhiên chế phẩm dạng chất mang bột cũng có những nhược điểm như: dễ bị tạp nhiễm bởi VSV không chuyên tính, chất lượng không ổn định, độ sống sót của VSV trong chế phẩm không cao. Nếu không sử dụng kịp thời, thì chế phẩm có thể bị loại bỏ hàng loạt vì không đảm bảo mật độ VSV chuyên tính.[7]

► Khái niệm về men vi sinh

Trong những năm gần đây, phong trào chăn nuôi đang phát triển mạnh theo hướng thâm canh, để bền vững đòi hỏi phải có giải pháp tốt trong quản lý chuồng trại và sinh vật nuôi. Hiện có xu hướng dùng VSV hay dẫn xuất của chúng trong chăn nuôi để khống chế dịch bệnh, cải thiện dinh dưỡng vật nuôi và cải thiện môi trường sống. Hiện có nhiều loại men vi sinh khác nhau lưu hành trên thị trường và tên gọi của chúng cũng phân loại không hoàn toàn

chính xác. Thuật ngữ “probiotics” được dùng khá phổ biến nhưng nhiều trường hợp vẫn chưa chính xác. Các khái niệm và tên gọi về việc các sản phẩm chứa vi sinh vật được gọi tên khác nhau tùy vào chức năng hoặc là tác dụng của chúng.

Vai trò và cơ chế tác động của men vi sinh và giá trị thật của nó cũng chưa được đánh giá đầy đủ, phần lớn cơ chế được suy diễn dựa trên các nghiên cứu trên người và động vật. Song một số cơ chế cũng đã được báo cáo và có thể là một trong những cơ chế sau:

- Tiết ra các hợp chất ức chế: có rất nhiều nghiên cứu chứng minh rằng có nhiều dòng vi khuẩn in-vitro hãm được các mầm bệnh trong chăn nuôi. Những nghiên cứu này cũng chứng minh khả năng kìm hãm vi khuẩn của những dòng vi khuẩn thông thường dễ tìm thấy trong môi trường (Fuller, 1989). Những quần thể sinh vật này có thể tiết vào môi trường những chất có tính sát khuẩn hoặc kìm khuẩn gây ảnh hưởng đến quần thể sinh vật khác, nhằm gián tiếp cạnh tranh dinh dưỡng và năng lượng có sẵn trong môi trường. Sự hiện diện những vi khuẩn này sản sinh chất kìm hãm, có thể tiết trong ruột, trên bề mặt cơ thể vật chủ làm rào cản sự nhân lên của vi khuẩn cơ hội gây ức chế các VSV gây bệnh. Trong sản xuất những dòng vi khuẩn có khả năng tiết ra chất kìm hãm mầm bệnh được ứng dụng trong các nghiên cứu về VSV hữu ích. Sản phẩm có thể là chất kháng sinh, siderophores, men phân hủy, H_2O_2 , acid hữu cơ,...(Sugita et al., 1997) [58]. Thành phần chất tiết ra khó có thể xác định được nên được gọi chung là chất ức chế. Vi khuẩn lactic từ lâu được biết là loại tiết ra chất kháng vi khuẩn (bacteriocin) chống lại các vi khuẩn Gram (+) (không chuyên biệt). Phần lớn các vi khuẩn gây bệnh là nhóm Gram (-). Vì vậy, tác động ức chế của vi khuẩn lactic trong bị hạn chế nhưng nó là vi khuẩn không có hại và là đối tượng cạnh tranh chỗ cư trú. Nhiều vi khuẩn khác cũng tiết ra chất ức chế chống lại các vi khuẩn gây bệnh như *Aeromonas hydrophila* và *Vibrio parahaemolyticus* (Nair et al., 1985) [46].

- Cạnh tranh dinh dưỡng và năng lượng: Nhiều quần thể vi sinh vật cùng tồn tại trong cùng một hệ sinh thái thì sẽ có sự cạnh tranh về dinh dưỡng và năng lượng. Cạnh tranh trong giới vi sinh vật chủ yếu là xảy ra ở nhóm dị dưỡng như cạnh tranh các chất hữu cơ mà chủ yếu là nguồn cacbon và năng lượng. Rico-Mora (1998) đã cho một dòng vi khuẩn được chọn lọc có khả năng phát triển trên môi trường nghèo hữu cơ. Tác giả cấy vi khuẩn này vào bể nuôi tảo khuê cùng với *Vibrio alginolyticus* thì vi khuẩn *Vibrio* này không phát triển và thử nghiệm in-vitro không thấy có sự ức chế. Do đó chúng tỏ vi khuẩn được chọn lọc cạnh tranh lấn át *Vibrio* trong điều kiện nghèo hữu cơ. Do vậy những dòng vi khuẩn chọn lọc sẽ có ưu thế trong việc cạnh tranh năng lượng và dinh dưỡng [55].

- Cạnh tranh nơi cư trú: Cạnh tranh chỗ bám trong ruột của vật chủ có ảnh hưởng rất quan trọng đến sức khỏe của vật chủ. Việc bám dính được vào lớp màng nhầy của ruột là rất cần thiết để vi khuẩn thiết lập quần thể trong hệ ruột của cá (Olsson et al., 1992, Westerdahl et al., 1992)[62]. Khả năng bám dính lên thành ruột là tiêu chuẩn lựa chọn đầu tiên của vi khuẩn hữu ích. Sự bám dính trên màng ruột có thể là chuyên biệt (các điểm hay các phân tử tiếp nhận), không chuyên biệt (dựa trên các yếu tố hóa lý). Khả năng bám dính và sự tăng trưởng trên bề mặt hay là trong lớp màng nhầy của thành ruột đã được thử nghiệm trong ống nghiệm đối với vi khuẩn gây bệnh trên cá như *Vibrio anguillarum* và *Aeromonas hydrophila* (Garcia et al., 1997) và dòng vi khuẩn hữu ích sử dụng trong thí nghiệm là *Carnobacterium* K1 (Jöborn et al., 1997) và vài dòng vi khuẩn phân lập có khả năng kìm hãm vi khuẩn *Vibrio anguillarum* (Olsson et al., 2004)[49].

- Cải thiện chất lượng môi trường: Cải thiện chất lượng môi trường là một cơ chế tác động của “vi sinh vật hữu ích” trong chăn nuôi khi đưa vi sinh vật hữu ích vào môi trường giúp cải thiện chất lượng môi trường mà không có tác động trực tiếp lên cơ thể vật nuôi, thường liên quan đến các nhóm *Bacillus*

(Verschuere et al., 2000)[61]. Nhóm vi khuẩn Gram (+) thường phân hủy vật chất hữu cơ thành CO₂ tốt hơn nhóm Gram (-). Duy trì mật độ vi khuẩn Gram (+) trong chuồng nuôi sẽ hạn chế được sự tích lũy vật chất hữu cơ trong chuồng trong suốt quá trình nuôi, ổn định quần thể VSV nhờ sự sản sinh CO₂ từ quá trình phân hủy các vật chất hữu cơ. Cải thiện chất lượng môi trường là một trong những vai trò quan trọng của vi khuẩn hữu ích trong chăn nuôi. Chất lượng môi trường có liên quan mật thiết đến quá trình hấp thụ và giải phóng các chất làm biến đổi chất lượng môi trường, đặc biệt là sự hấp thụ và giải phóng dinh dưỡng của vật nuôi. Ngoài ra phải cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng.

- Vũ Ngọc Út (2008) cho rằng sự tác động của “probiotics” lên vật chủ theo hai hướng có lợi và có hại. Những tác động có lợi: thứ nhất là ngăn chặn vi khuẩn có hại do tạo các chất kháng khuẩn, cạnh tranh thức ăn và không gắn với các loại vi khuẩn có hại. Thứ hai là tương tác với quá trình trao đổi chất của vật chủ hay hệ sinh vật trong cơ thể vật chủ với quá trình enzym hỗ trợ cho tiêu hoá, giảm lượng ammonia hay những enzym độc hại và cải thiện chức năng của thành ruột. Thứ ba là cải tiến phản ứng miễn dịch của vật chủ theo do nồng độ kháng thể gia tăng và tăng số lượng đại thực bào. Thứ tư là cải thiện môi trường, các vi khuẩn có lợi phân huỷ các chất hữu cơ có từ thức ăn dư thừa, các chất bài tiết và có thể ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, giúp giảm ô nhiễm. Ngoài những ảnh hưởng có lợi, những tác động có hại là cạnh tranh các chất dinh dưỡng (glucose và các acid amin) với vật chủ. Vi sinh vật thuộc nhóm *Bacillus* nhờ môi trường thích hợp (vừa nêu trên) sẽ phát triển số lượng rất lớn, cạnh tranh sử dụng hết thức ăn của nguyên sinh động vật, các VSV có hại, ngăn cản sự phát triển của chúng. Nhờ đó mà hạn chế sử dụng các hoá chất và thuốc kháng sinh, giảm thay nước trong quá trình nuôi, góp phần cải thiện chất lượng môi trường sống.[13]

1.10. Tình hình nghiên cứu

1.10.1. Trên thế giới

Kháng sinh được sử dụng từ chiến tranh thế giới lần II, và có vai trò như một loại thuốc để điều trị bệnh cho người và động vật. Chúng được sử dụng rộng rãi ở nhiều quốc gia để ngăn ngừa một số bệnh và tăng trưởng trong chăn nuôi [20]. Nhiều trường hợp, con người quá lạm dụng kháng sinh trong y học, công-nông nghiệp đã xuất hiện vi khuẩn kháng kháng sinh. Từ đó liệu pháp mới ra đời là dùng vi sinh probiotics [59].

Nghiên cứu vai trò của vi sinh vật trong chế phẩm probiotics đã được quan tâm ở một số nước trên thế giới. Họ đã nghiên cứu và ứng dụng trong chăn nuôi gia cầm, gia súc, thực phẩm,... Probiotics là các vi sinh vật sống, an toàn và có lợi cho sức khỏe của con người, gia súc, gia cầm và môi trường. Bao gồm các nhóm vi sinh vật sau: *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacilli*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Saccharomyces*,...[48].

Fumiaki Abe và Norio Ishibashi (1995) đã nghiên cứu cho bê và heo con uống vi khuẩn *Bifidobacteria* và vi khuẩn *Lactic*. Kết quả cho thấy nhóm gia súc xử lý có tăng trọng cao hơn nhóm đối chứng, sau 56 ngày tuổi bê có khối lượng là 31,8kg so với đối chứng có sử dụng kháng sinh bổ sung là 25,4kg. Hiệu suất sử dụng thức ăn ở nhóm bê có xử lý là 2,07 (kg thức ăn/ kg tăng trọng) thấp hơn so với nhóm đối chứng là 2,37. Số con mắc bệnh tiêu chảy là 1/45con so với đối chứng là 7/45 con. Thí nghiệm trên heo con, kết quả cho thấy: sau 28 ngày tuổi heo con lô thí nghiệm có tăng trọng là 5,7 kg so với đối chứng là 4,8 kg và sau 56 ngày tăng trọng là 17,3 kg so với đối chứng là 14,5 kg. Hệ số tiêu thụ thức ăn là 2,16 so với đối chứng là 2,21 kg. Đặc biệt tỉ lệ heo con sống là 95% so với lô đối chứng là 75%.[24]

Ở Châu Á đã có nhiều nghiên cứu sử dụng các chế phẩm vi sinh trong nuôi tôm, đặc biệt ở Thái Lan. Jiravanichpaisal & ctv (2007) đã sử dụng *Lactobacillus* sp. trong nuôi tôm sú (*P. monodon* *Fabrius*).[35]

Nấm men và nấm mốc cũng được sử dụng để cải thiện tỷ lệ sống và năng suất ấu trùng tôm *Litopenaeus vannamei* (Intriago et al., 1993).[29]

Những nhà khoa học từ viện nghiên cứu thực phẩm ở Norwich, nước Anh báo cáo là những probiotics đặc biệt có thể tiêu diệt mầm bệnh vi khuẩn sống ở ruột gia cầm, do đó giúp loại bỏ mối đe dọa sự ngộ độc thực phẩm vi khuẩn từ chuỗi thức ăn.

Sử dụng probiotics trong nuôi trồng thủy sản sẽ hạn chế dùng một lượng lớn chất kháng sinh và hóa chất vào ao nuôi thủy sản. Đặc biệt là hạn chế đáng kể khả năng gây bệnh của một số vi khuẩn có hại trên đối tượng nuôi đây là biện pháp tăng hiệu quả sản xuất có ý nghĩa thực tiễn không chỉ cải thiện chất lượng nước, giảm lượng dùng kháng sinh, giảm mầm bệnh trong ao mà còn có thể nâng cao năng suất nuôi và chất lượng của sản phẩm. Salah Mesalhy Alya (2008) ứng dụng thành công các vi khuẩn có lợi mà cụ thể là nhóm vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Lactobacillus acidophilus* trong nuôi cá rô phi nhằm để hạn chế mầm bệnh do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra.[56]

Vi khuẩn *Vibrio* là một thảm họa do nghề nuôi tôm ở Philippine, khi việc sử dụng kháng sinh để trị không còn tác dụng nhiều ngược lại còn có thể làm cho vi khuẩn kháng thuốc, mà xa hơn nữa là vi khuẩn có nhiều khả năng gây bệnh đến con người nếu sử dụng quá liều lượng. Vì lý do đó mà probiotics được ứng dụng rộng rãi cho nghề nuôi tôm ở Philippine, nghiên cứu cho thấy rằng có thể cứu sống 80% tôm bệnh khi trong ao nuôi có sử dụng chế phẩm sinh học (Moriarty, 1997).[45]

Probiotics đóng vai trò rất quan trọng trong nuôi thủy sản. Nhưng việc sử dụng probiotics còn phụ thuộc nhiều vào sự am hiểu về bản chất của các VSV có ích và đặc điểm sinh học của đối tượng vật nuôi (Balcázar et al., 2008).[17]

Mô hình nuôi thủy sản thâm canh thường tích lũy nhiều vật chất hữu cơ ở đáy ao do thức ăn dư thừa, phân và các chất thải khác của thủy sinh vật làm môi trường sống của vật nuôi bị ô nhiễm tạo điều kiện cho mầm bệnh bọ

phát gây thiệt hại lớn trong nuôi thủy sản. Không chỉ vậy bào tử *Bacillus* cũng được sử dụng như một tác nhân sinh học giúp giảm bệnh *Vibrio* trong hệ thống nuôi thủy sản (Skjermo và Vadstein, 2000)[57]. Ba chủng vi khuẩn lactic đưa vào môi trường nuôi luân trùng dùng làm thức ăn cho cá bơn (Gatesoupe, 1991)[25].

Meunpol et al., (2002) sử dụng probiotic với dòng vi khuẩn *Bacillus* S11 trộn vào thức ăn viên công nghiệp cho ấu trùng tôm sú ăn. Sau khi cho ăn thức ăn trộn probiotic trong 1 tháng thì cấy vi khuẩn *Vibrio harveyi* rồi xục ozone vào từng bể (0,333 - 0,341 mg O₃/ml). Tỷ lệ sống của tôm được xác định sau 6 ngày đạt cao nhất 75% so với nghiệm thức đối chứng tỷ lệ sống chỉ có 18%.[44]

1.10.2. Trong nước

Ứng dụng trong lĩnh vực nông nghiệp là sản xuất thức ăn chăn nuôi. Một số vi sinh vật có khả năng sản xuất probiotics có tác dụng điều hoà hệ thống vi sinh vật trong đường tiêu hoá và người ta đã lợi dụng đặc tính này của vi sinh vật để sản xuất các chế phẩm probiotics làm thức ăn bổ sung trong chăn nuôi.[7]

Hiện nay ở Việt Nam đang đẩy mạnh việc nghiên cứu để sản xuất probiotics dùng trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên sản phẩm tinh chế thì giá thành còn cao nên ở nước ta hiện nay vẫn sử dụng nguồn nguyên liệu chủ yếu là các loại phụ phẩm của ngành nông nghiệp. Do đó giá thành của probiotics giảm xuống nhiều và cũng giúp cho vật nuôi tiêu hóa tốt hơn, giảm tỷ lệ bệnh và góp phần cải thiện môi trường.

Vi sinh vật gây bệnh ảnh hưởng rất lớn đến năng suất và tính ổn định trong chăn nuôi. Để kiểm soát vi sinh gây hại, phương pháp truyền thống là dùng các hóa chất diệt khuẩn và kháng sinh, tuy nhiên các hóa chất diệt khuẩn như Chlorin ngoài việc làm tăng mật độ *Vibrio* sau khi sử dụng, các dẫn xuất của chlorin còn là những chất gây đột biến và ung thư như: chloroform

(CHCl_3), bromodichloro-methane (CHBrCl_2), dibromodichloro-methane (CHBrCl_2), và bromoform (CHBr_3).

Các loại kháng sinh tạo ra các chủng kháng kháng sinh, các plasmid mã hóa cho các gen kháng kháng sinh sẽ truyền từ vi sinh vật gây bệnh ở gia cầm sang các vi sinh vật gây bệnh cho động vật và người. Vì lẽ đó ngày nay nhiều loại kháng sinh đã bị cấm sử dụng trong chăn nuôi gia cầm ở nước ta. Ngày nay probiotics được sử dụng khá hiệu quả để phòng bệnh cho người và gia súc, gia cầm trên cạn.

Tại Việt Nam chăn nuôi gia cầm chủ yếu theo phương pháp truyền thống với quy mô gia đình. Theo số liệu ước tính số gia cầm quy mô hộ gia đình đóng góp hàng năm khoảng 550.000 USD hay 0.5% tổng số GDP của Việt Nam (Otte *et al.*, 2002).[50]

- Tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi ở Việt Nam là đáng báo động. Nguyễn Như Pho (2003) điều tra cho thấy trong chăn nuôi heo có sử dụng tới 19 loại kháng sinh khác nhau và lượng tồn dư kháng sinh trong thịt heo vượt quá tiêu chuẩn cho phép là 65% ở chăn nuôi heo công nghiệp và 42% ở chăn nuôi hộ gia đình [6]. Đinh Thiện Thuận (2003) điều tra 628 cơ sở chăn nuôi tại Bình Dương cho thấy cũng có trên 26 loại kháng sinh được sử dụng. Đặc biệt chloramphenicol được sử dụng với tần số cao nhất 17,91%, đây là kháng sinh bị cấm do gây suy tuỷ dẫn đến tử vong. Điều này ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe của người tiêu dùng. Tỷ lệ tồn dư trong thịt heo, gà tại Bình Dương là 45,63%, mức độ tồn dư cao hơn tiêu chuẩn từ 2,5-16,6 lần và tồn dư chloramphenicol là cao nhất (65,62% số mẫu). Đây thực sự là con số đáng báo động và các nhà khoa học, nhà quản lý cần có biện pháp quản lý, chấn chỉnh thực trạng này [8].

- Được ứng dụng trong chế biến thực phẩm có lợi cho sức khỏe như sữa chua, phomat, kem. Các sản phẩm probiotics này có chứa vi sinh vật có lợi cho đường tiêu hóa, giúp hấp thụ thức ăn tốt hơn và cải thiện sức khỏe. Theo

tổ chức Y tế thế giới, thực phẩm probiotics là các sản phẩm thực phẩm có chứa vi sinh vật sống với lượng tế bào đủ đảm bảo mang lại lợi ích cho sức khỏe. Điều này có nghĩa thực phẩm chức năng phải đảm bảo mức độ sống và hoạt lực trao đổi chất của sinh khối để tiến hành thủy phân trong hệ tiêu hóa. Do đó, phải được đảm bảo ở tất cả các giai đoạn trong quá trình chế biến thực phẩm, cũng như đảm bảo mức độ sống sót của vi khuẩn trong đường tiêu hóa. Do nhiều yếu tố, một phần lớn lượng vi sinh vật có lợi trong đường ruột bị giảm hay bị tiêu diệt như bị tiêu chảy, sử dụng kháng sinh trong chữa bệnh, điều này ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng hoạt động của hệ tiêu hóa như thủy phân đường lactose trong sữa, giảm khả năng hấp thụ thức ăn của cơ thể và giảm tính đề kháng của cơ thể. Cơ thể cần bổ sung một lượng đủ lớn sinh khối vi khuẩn có lợi nhằm cải thiện sức khỏe.

Theo các nghiên cứu trước đây, probiotics là những chế phẩm vi sinh vật sống khi hấp thu vào cơ thể mang lại lợi ích sau:

Cải thiện hệ thống miễn dịch cơ thể: thực phẩm chức năng probiotics có thể góp phần cải thiện hệ thống miễn dịch của cơ thể, làm tăng hàm lượng globulin. Sự hấp thụ thực phẩm probiotics cải thiện rõ rệt sức đề kháng của cơ thể. Tăng cường hiệu quả của một số vaccin như vaccin thương hàn. Giảm sự phát triển của mầm bệnh và cải thiện hệ thống miễn dịch của dạ dày và giảm nguy cơ nhiễm một số mầm bệnh phổ biến như Salmonella và Shigella.

Chống dị ứng: thực phẩm probiotics góp phần chống lại được một số dị ứng của cơ thể, cung cấp nhiều chất quan trọng cho cơ thể như folic acid, niacin, riboflavin và vitamin B6, B12.

Chống ung thư: nhiều nghiên cứu đã cho thấy vi sinh probiotics có thể làm giảm nguy cơ ung thư ruột kết. Ngoài ra có tác dụng khử chất độc gây ung thư có trong cơ thể và làm chậm sự phát triển của các khối u bướu.

Một số tác dụng khác: probiotics có tác dụng làm giảm nồng độ cholesterol trong huyết thanh. Ngoài ra, giúp nhanh chóng bình phục sau khi mắc các bệnh tiêu chảy và sử dụng nhiều kháng sinh.

- Ứng dụng probiotics vào trong chế biến nước quả mở ra một hướng nghiên cứu nhằm đa dạng hóa sản phẩm, tăng chất lượng và tạo ra những sản phẩm đồ uống có lợi cho sức khỏe. Viện Nghiên cứu Rau Quả đang tập trung nghiên cứu và tiến tới đưa ra thị trường và tạo ra những sản phẩm đồ uống mới đáp ứng nhu cầu thị hiếu và có lợi cho sức khỏe cho người sử dụng trong nước, đồng thời hướng tới xuất khẩu.[15]

- Bùi Công Trục (2003) sử dụng ba chế phẩm Paciflor, Pacicoli và Acid pak. Kết quả cho thấy chế phẩm Paciflor (*Bacillus cereus*) làm giảm tỷ lệ heo tiêu chảy 2-4,6% và tăng hiệu quả kinh tế lên 30% so với đối chứng.[11]

- Tính kháng khuẩn của probiotics được ứng dụng nhiều nhất trong công nghệ thực phẩm cũng như trong dược phẩm. Sở dĩ các vi khuẩn này có khả năng kháng khuẩn tốt là do trong quá trình trao đổi chất đã tạo ra các sản phẩm có tính kháng khuẩn như acid hữu cơ (acid lactic và acid acetic), hydroperoxide, ethanol, diacetyl, acetaldehyde, acetoine, CO₂, reuterin, reutericyclin và bacteriocin... Các sản phẩm trao đổi chất này chính là "vũ khí" kháng khuẩn của probiotics.[34]

▪ Khả năng kháng khuẩn của các acid hữu cơ: các acid hữu cơ được sinh ra bởi vi khuẩn lactic chủ yếu là acid lactic và acid acetic, các acid này góp phần giảm pH tiêu diệt các vi khuẩn có hại ví dụ như vi khuẩn *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphilococcus aurius*... Do nội bào vi khuẩn có pH = 7 nên khi có sự chênh lệch pH so với môi trường acid bên ngoài, H⁺ từ môi trường sẽ đi vào bên trong tế bào vi khuẩn làm pH nội bào giảm. Vi khuẩn phải sử dụng cơ chế bơm ATPase để đẩy H⁺ ra khỏi tế bào làm cho vi khuẩn bị mất năng lượng. Mặt khác pH giảm thì cũng ức chế quá trình đường phân (glycolysis), tế bào vi khuẩn cạn kiệt năng lượng dẫn đến bị

tiêu diệt. Ngoài ra, các anion của acid còn gây rối loạn sự thẩm thấu của màng tế bào. Những nguyên nhân này làm cho vi khuẩn bị chết.[3]

- Khả năng kháng khuẩn của bacteriocin: bacteriocin là chất kháng khuẩn có bản chất là protein được ribosom tổng hợp từ các chuỗi peptit hoặc protein ở cả vi khuẩn gram âm và vi khuẩn gram dương. Bacteriocin có tác dụng kháng khuẩn đối với các vi khuẩn gây thối rữa và các mầm bệnh trong thực phẩm phổ biến là vi khuẩn *Listeria monocytogenes* và *Staphylococcus aureus*.

- Bacteriocin được chia thành 4 nhóm: Nhóm I là nhóm lantibiotic, là polypeptit có trọng lượng phân tử < 5KDa. Nhóm II gồm các bacteriocin không phải là lantibiotic, có khối lượng <10KDa, nhóm này lại chia ra thành 3 nhóm nhỏ khác. Nhóm III là bacteriocin có trọng lượng phân tử > 30KDa, nhóm IV là các bacteriocin phức tạp, ngoài thành phần chính là protein chúng còn chứa lipid và cacbonhydrat.

- Cơ chế tác động bacteriocin rất đa dạng, nó có thể làm biến đổi các enzym, ức chế sự sản sinh bào tử, chúng xâm nhập vào tế bào làm mất lực đẩy proton, làm giảm thế năng của màng nguyên sinh chất và thay đổi pH nội bào do đó tạo ra các lỗ thủng không thể khắc phục được dẫn đến tế bào bị phá vỡ.

- Trong công nghệ thực phẩm, nisin là bacteriocin được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi nhất trong chế biến và bảo quản một số loại thực phẩm như phomat, xúc xích, sữa chua, một số loại sản phẩm thịt, rau quả đóng hộp... Trong y dược, bacteriocin còn được ứng dụng như một chế phẩm sinh học để điều trị một số bệnh như viêm đường tiết niệu, hay nhiễm trùng đường tiêu hoá...

Ngoài ra, reuterin và dẫn xuất của reutericyclin cũng có thể ức chế các vi khuẩn gram âm và gram dương, nấm và động vật nguyên sinh như giun, sán... Các diacetyl, acetaldehyde và acetoin cũng có tác dụng kìm hãm đối với các vi sinh vật có hại ngay cả ở nồng độ thấp.[4]

Vi khuẩn hữu ích đóng vai trò quan trọng trong nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là liên quan đến sản xuất sơ cấp, phân hủy chất hữu cơ, cải thiện chất lượng nước trong ao. Chúng còn chuyển hóa các chất độc như ammoniac và hợp chất nitơ. Trong thủy vực, các vật chất hữu cơ không ngừng bị phân hủy bởi các vi sinh vật vì chúng cần các hợp chất này để làm thức ăn. Các chất hữu cơ được chúng hấp thụ làm tiền chất cho việc xây dựng cấu trúc cơ thể và tạo năng lượng cho các hoạt động sống. Khi ấy, hợp chất hữu cơ được vi sinh vật biến đổi thành các chất nghèo năng lượng và cuối cùng trong những điều kiện thích hợp thì chuyển hóa ngược lại thành các chất vô cơ ban đầu được gọi là quá trình vô cơ hoá. Quá trình này sẽ tái tạo trở lại vòng tuần hoàn trong thủy vực, tạo nên sự sinh trưởng mới của thực vật. Nếu không có vi sinh vật phân hủy hữu cơ thì toàn bộ quá trình chuyển hóa vật chất trong thủy vực sẽ ngừng lại và sự sống sẽ không tồn tại được. (Đặng Thị Hoàng Oanh, 2005).[12]

Việc sử dụng vi khuẩn đường ruột có lợi trong thức ăn cho người và động vật trên cạn đã được biết đến nhiều. *Lactobacillus acidophilus* được sử dụng phổ biến để kiểm soát và phòng bệnh do các vi sinh vật mầm bệnh trong ống tiêu hóa của nhiều động vật trên cạn. Vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* có trong yaourt giúp tăng khả năng tiêu hóa và kháng lại vi khuẩn có hại trong đường ruột. Lý thuyết kiểm soát sinh học đã được áp dụng trong nuôi trồng thủy sản. Nhiều nhà khoa học đã cố gắng sử dụng một số loại probiotics trong nuôi thủy sản để điều khiển quần thể vi tảo của nước trong ao, kiểm soát vi sinh vật gây bệnh, để tăng cường sự phân hủy các hợp chất hữu cơ dư thừa và cải thiện môi trường ao nuôi. Ngoài ra, việc sử dụng probiotics có thể gia tăng quần thể các sinh vật làm thức ăn, cải thiện mức dinh dưỡng của các loài thủy sản nuôi và tăng cường khả năng miễn dịch của vật nuôi với mầm bệnh. Như vậy, định nghĩa của probiotics đối với nuôi trồng thủy sản được mở rộng, nó bao gồm cả việc bổ sung vi khuẩn sống vào ao nuôi, những vi khuẩn có lợi

này sẽ cải thiện thành phần vi sinh vật của nước và nền đáy nhằm cải thiện chất lượng nước. Probiotics được giả định là gia tăng tình trạng sức khỏe của vật nuôi bằng việc loại trừ các mầm bệnh hoặc hạn chế tối đa tác hại trực tiếp của mầm bệnh. Vi khuẩn probiotics có thể bám vào bề mặt bên ngoài của vật chủ hay đi vào trong ruột hoặc trực tiếp từ nước hoặc qua thức ăn hay qua những hạt có thể tiêu hóa được. Hơn nữa, sử dụng probiotics sẽ góp phần làm giảm sử dụng hóa chất, kháng sinh trong phòng và trị bệnh cho tôm cá nuôi.

Đắk Lắk là một tỉnh có tiềm năng to lớn trong phát triển nông nghiệp. Sản xuất nông nghiệp chiếm tới 70% GDP. Trong những năm gần đây, chăn nuôi đang có chuyển biến tích cực. Nhiều trang trại chăn nuôi theo hướng công nghiệp đang được phát triển góp phần đáng kể thay đổi cơ cấu nông nghiệp. Chăn nuôi của tỉnh đang theo hướng phát triển với qui mô trang trại vừa và nhỏ. Thực trạng chăn nuôi gà ở Đắk Lắk cũng không nằm ngoài thực trạng chung của Việt Nam hiện nay là lạm dụng kháng sinh và chất thải chăn nuôi gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe của người tiêu dùng.

Bảng 1.1: Tình hình chăn nuôi gia cầm Đắk Lắk trong 10 năm (2000-2009)

ĐVT: 1000 con

Năm	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Gia cầm	2.849	3.090	3.864	4.543	4.560	4.481	3.514	3.479	5.836	6.279
Tỷ lệ (%)	-	108	125	117	100	98	78	99	167	107

(Nguồn: Niên giám thống kê Đắk Lắk 2009)

CHƯƠNG 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả đặc điểm sinh học của một số chủng vi sinh probiotics.

- Nghiên cứu quy trình lên men các chủng vi sinh probiotics và chế phẩm probiotics.

- Nghiên cứu hiệu quả của việc sử dụng chế phẩm probiotics trong chăn nuôi gà đẻ trứng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng và vật liệu

2.2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Một số vi sinh vật đại diện trong chế phẩm probiotics là: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp. thu thập từ Viện Sinh học Nhiệt Đới.

- Gà đẻ trứng – giống Chibi – Thái Lan, 19 tuần tuổi.

2.2.1.2. Môi trường nuôi cấy

- Môi trường cao thịt-peptone nuôi cấy *Bacillus subtilis* với công thức: cao thịt 3g, peptone 10g, NaCl 5g, agar 15g, nước cất 1000 ml, pH 6,0.[9]

- Môi trường MRS nuôi cấy *Lactobacillus acidophilus*: glucose 20g, peptone 10g, cao thịt 10g, cao nấm men 5g, Na-axetate.3H₂O 5g, Na₃PO₄ 2g, ammonium citrate 2g, tween 80 1g, MgSO₄.7H₂O 0,2g, MnSO₄.4H₂O 0,05g, agar 15g, nước cất 1000ml, pH 6,2.[52]

- Môi trường Hansen nuôi cấy *Saccharomyces cerevisiae*: glucose 50g, peptone 10g, KH₂PO₄ 3g, MgSO₄ 3g, agar 20g, nước cất 1000 ml, pH 6,0.[9]

- Môi trường Winogradski phân lập *Nitrosomonas* sp.: (NH₄)₂SO₄ 2g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄.7H₂O 0,5g, FeSO₄.7H₂O 0,4g, NaCl 2g, nước cất 1000

ml, CaCO₃ 1g (cần lưu ý chọn những hạt CaCO₃, vì xung quanh hạt này tỉ lệ vi khuẩn cao nhất).[10]

Khử trùng môi trường ở 1atm, trong thời gian 30 phút.

2.2.1.3. Thiết bị và địa điểm nghiên cứu

- Thiết bị: nồi hấp vô trùng, buồng cấy vi sinh, tủ lạnh, tủ sấy, tủ âm, kính hiển vi, máy cất nước, máy quang phổ UV/Vis, máy lắc, pH meter, cân phân tích,....

- Địa điểm nghiên cứu:

- Phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh học thực vật Khoa Nông lâm Trường Đại học Tây Nguyên.

- Trại gà xã EaKao, Tp. Buôn Ma Thuột.

2.2.2. Phương pháp phân lập và bảo quản mẫu

2.2.2.1. Phân lập vi sinh vật

Phân lập vi sinh vật là quá trình tách riêng các loài vi sinh vật từ quần thể ban đầu.

2.2.2.1.1. Nguyên tắc

- Tách rời các tế bào vi sinh vật.

- Nuôi cấy các tế bào trên trong môi trường dinh dưỡng đặc trưng để cho khuẩn lạc riêng rẽ, cách biệt nhau.

2.2.2.1.2. Quá trình phân lập vi sinh vật ở dạng thuần khiết

Với hầu hết các loại mẫu nghiên cứu, quá trình phân lập vi sinh vật ở dạng thuần khiết gồm các bước cơ bản:

- Tạo ra các khuẩn lạc riêng rẽ từ quần thể vi sinh vật ban đầu (mẫu ở dạng lỏng).

+ Tiếp tục pha loãng ở nồng độ cần thiết.

+ Cấy mẫu trên môi trường đặc trưng của nó.

- Phân lập các vi sinh vật trên môi trường đặc ở đĩa petri.

+Hút 0.1 ml dịch mẫu đã pha loãng cho vào đĩa peptri có môi trường thích hợp.

+ Dùng que gạt thủy tinh phân phối dịch mẫu trải đều khắp mặt thạch, ta sẽ nhận được các khuẩn lạc riêng rẽ.

- Kiểm tra độ tinh khiết của giống mới phân lập.

+ Kiểm tra vết cấy:

Quan sát sự sinh trưởng của vi sinh vật qua vết cấy trên môi trường đặc.

- Nếu vết cấy có bề mặt và màu sắc đồng đều, thuần nhất chứng tỏ giống mới phân lập tinh khiết thì giữ lại.

- Nếu vết cấy không đồng nhất thì loại bỏ.

+ Kiểm tra lại độ thuần chủng của các khuẩn lạc

- Chọn các khuẩn lạc riêng rẽ trên môi trường thạch nghiêng.

- Tách các khuẩn lạc này ra và hòa tan, pha loãng ở nồng độ cần thiết trong nước cất vô trùng.

- Nhỏ 1 giọt dịch trên vào đĩa peptri có môi trường.

- Dùng 1 que gạt phân phối giọt dịch đều khắp mặt thạch đĩa peptri.

- Đặt đĩa peptri trên vào tủ ấm với nhiệt độ và thời gian thích hợp tùy loại vi sinh vật.

- Sau lấy ra quan sát các khuẩn lạc riêng rẽ. Sự thuần khiết của khuẩn lạc là biểu hiện sự thuần khiết của giống.[10]

2.2.2.2. Phương pháp mô tả đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh học

- Mô tả các đặc điểm sinh học, hình thái của các loài dưới kính hiển vi. Sau khi nuôi cấy 24h tiến hành quan sát khuẩn lạc đơn dưới kính lúp để xác định hình dạng, cấu trúc, màu sắc, mặt cắt ngang.[2]

- Làm tiêu bản với thuốc nhuộm methyl blue và quan sát tế bào bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 100×10.

- *Bacillus subtilis* (dương tính với catalase) và *Lactobacillus acidophilus* (âm tính với catalase). Vi khuẩn có enzyme catalase để phân hủy H_2O_2 , đây là phản ứng giúp phân biệt hai vi khuẩn này.

- Trên một lame sạch, đặt một giọt nước oxy già (H_2O_2).
- Dùng dây cấy lấy chính xác khuẩn lạc cần thử đặt vào giọt oxy già.
- Nếu có bọt khí sủi lên là catalase dương tính, ngược lại là âm tính.

- *Nitrosomonas* sp.

- Môi trường đã hấp khử trùng và bổ sung 1ml mẫu cấy, ủ ở $30^\circ C$ trong 48h.
- Lấy vài tinh thể diphenylamine hòa tan trong 1 giọt H_2SO_4 đậm đặc.

Sau đó thêm một giọt dịch cần kiểm tra. Tiến hành trên bản sứ trắng sẽ thấy xuất hiện màu xanh thẫm.

2.2.2.3 Bảo quản và giữ giống

Bảo quản và giữ giống thí nghiệm bằng cách cấy truyền trong đĩa peptri và ống thạch nghiêng. Dùng que cấy hơ trên ngọn lửa đèn cồn, để nguội, sau đó gạt nhẹ lên khuẩn lạc rồi ria lên mặt thạch của đĩa và ống theo những hình dạng khác nhau. Dùng nút bông đã khử trùng miệng ống, đầu ống được gói kín bằng giấy báo đã được khử trùng. Ghi ngày tháng cấy lên đĩa và ống, sau đó để vào tủ ấm $30^\circ C$. Sau 1-2 ngày, khi khuẩn lạc đã mọc đều và mạnh, gói bọc ống giống và để vào tủ lạnh khoảng $0-4^\circ C$. Các ống giống có thể giữ được trong thời gian là 1-2 tháng và phải cấy truyền giữ giống trong khoảng thời gian đó.[9]

2.2.3. Phương pháp phân tích định lượng vi sinh vật

- Hút chính xác 100 μl mẫu, cho vào đĩa peptri (có môi trường đặc trung + agar) vô trùng và trải đều trên bề mặt thạch. Thực hiện pha loãng mẫu trong dung dịch NaCl 0,5%. Các dụng cụ tiến hành thí nghiệm đều vô trùng và mọi thao tác được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Thí nghiệm thực hiện ở ba độ pha loãng liên tiếp, mỗi độ pha loãng thực hiện 3 đĩa peptri. Thí nghiệm

lặp lại hai lần, ủ 1-2 ngày, đếm khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa có số khuẩn lạc từ 10 đến 100. Lượng vi sinh vật có trong mẫu được tính như sau:

$$A(\text{CFU/ml(g)}) = \frac{N}{n_1 V_{f1} + \dots + n_i V_{fi}}$$

Trong đó: A (Colony Forming Unit/ml): đơn vị hình thành khuẩn lạc trong 1 ml mẫu.

N: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa được chọn.

V: thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa (ml).

n_i : số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i .

f_i : độ pha loãng tương ứng.

► *Phương pháp pha loãng dung dịch*

Chuẩn bị ống nghiệm: lấy đủ ống nghiệm cho mục đích pha loãng. Rửa sạch ống nghiệm và sấy khử trùng ở 160°C trong 1 giờ. Đặt ống nghiệm vào buồng cấy vô trùng và bật đèn cực tím trong 30 phút.

Hút 9 ml nước muối sinh lý vô trùng cho vào các ống nghiệm. Hút 1 ml dung dịch mẫu cho vào ống nghiệm thứ nhất, lắc đều. Sau đó, hút 1 ml dịch từ ống thứ nhất sang ống thứ hai rồi lắc đều và cứ như vậy tiếp tục hút sang các ống tiếp theo cho đến nồng độ cần pha. Khi được dung dịch có nồng độ cần thiết ta tiến hành cấy trải lên các đĩa petri.

► *Phương pháp chuẩn bị giống thí nghiệm*

Chuẩn bị các bình tam giác chứa 100 ml môi trường nuôi cấy đã khử trùng để hoạt hóa giống. Dùng que cấy lấy giống từ các ống giống đưa vào các bình tam giác, lắc đều bằng tay hoặc bằng máy lắc để hoạt hóa giống trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng 28-30°C. Giống hoạt hóa này được sử dụng cho các thí nghiệm trong quy trình nuôi cấy.

Lưu ý: Tất cả các dụng cụ đều phải vô trùng và mọi thao tác phải được thực hiện trong box cấy vô trùng.

- Phương pháp đo độ đục ở bước sóng 625 nm.

2.2.4. Phương pháp nghiên cứu xây dựng quy trình nuôi cấy các chủng vi sinh probiotics

- Các thí nghiệm ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật.

* Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Bảng 2.1: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của B.subtilis

	MT1-B	MT2-B	MT3-B
<i>Bacillus subtilis</i>	- Cao thịt 3g - Peptone 10g - NaCl 5g - Nước cất 1000ml	- Cao thịt 3g - CO(NH ₂) ₂ 10g - NaCl 5g - Nước cất 1000ml	- Cao thịt 3g - (NH ₄) ₂ SO ₄ 10g - NaCl 5g - Nước cất 1000ml

Bảng 2.2: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của L.acidophilus

	MT1-L	MT2-L	MT3-L
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	- Glucose 20g - Peptone 10g - Cao thịt 10g - Cao nấm men 5g - Na-axetate.3H ₂ O 5g - Na ₃ PO ₄ 2g - Ammonium citrate 2g - Tween 80 1g - MgSO ₄ .7H ₂ O 0,2g - MnSO ₄ .4H ₂ O 0,05g - Nước cất 1000ml	- Glucose 20g - CO(NH ₂) ₂ 10g - Cao thịt 10g - Cao nấm men 5g - Na-axetate.3H ₂ O 5g - Na ₃ PO ₄ 2g - Ammonium citrate 2g - Tween 80 1g - MgSO ₄ .7H ₂ O 0,2g - MnSO ₄ .4H ₂ O 0,05g - Nước cất 1000ml	- Glucose 20g - (NH ₄) ₂ SO ₄ 10g - Cao thịt 10g - Cao nấm men 5g - Na-axetate.3H ₂ O 5g - Na ₃ PO ₄ 2g - Ammonium citrate 2g - Tween 80 1g - MgSO ₄ .7H ₂ O 0,2g - MnSO ₄ .4H ₂ O 0,05g - Nước cất 1000ml

Bảng 2.3: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của *S.cerevisiae*

	MT1-S	MT2-S	MT3-S
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- Glucose 50g - Peptone 10g - KH ₂ PO ₄ 3g - MgSO ₄ 3g - Nước cất 1000 ml	- Maltose 50g - Peptone 10g - KH ₂ PO ₄ 3g - MgSO ₄ 3g - Nước cất 1000 ml	- Shaccarose 50g - Peptone 10g - KH ₂ PO ₄ 3g - MgSO ₄ 3g - Nước cất 1000 ml

Bảng 2.4: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của *Nitrosomonas* sp.

	MT1-N	MT1'-N	MT2-N	MT2'-N
<i>Nitrosomonas</i> sp.	- (NH ₄) ₂ SO ₄ 2g - K ₂ HPO ₄ 1g - MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5g - FeSO ₄ .7H ₂ O 0,4g - NaCl 2g - Nước cất 1000 ml	- (NH ₄) ₂ SO ₄ 4g - K ₂ HPO ₄ 1g - MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5g - FeSO ₄ .7H ₂ O 0,4g - NaCl 2g - Nước cất 1000 ml	- NaNO ₂ 1g - K ₂ HPO ₄ 0,5g - MgSO ₄ .7H ₂ O 0,3g - Na ₂ CO ₃ 1g - NaCl 0,5g - FeSO ₄ 0,1g - Nước cất 1000 ml	- NaNO ₂ 2g - K ₂ HPO ₄ 0,5g - MgSO ₄ .7H ₂ O 0,3g - Na ₂ CO ₃ 1g - NaCl 0,5g - FeSO ₄ 0,1g - Nước cất 1000 ml

Nuôi cấy trên các môi trường khác nhau, lặp lại 3 lần để tìm môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của các chủng.

* Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Sau khi tìm được môi trường tối ưu. Với bình tam giác 250ml có chứa 49 ml môi trường tương ứng, hấp khử trùng ở 121°C, 1atm, 30 phút. Bổ sung vào mỗi bình tam giác 1 ml dung dịch giống đã hoạt hóa. Tiến hành theo dõi với

các khoảng thời gian nuôi cấy: 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 96h với ba lần lặp lại. Tiến hành đo độ đục với các bước sóng tương ứng.

* Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của pH

Với môi trường và thời gian sinh trưởng thích hợp, tiến hành chuẩn độ pH của môi trường bằng cách sử dụng máy đo pH meter và hóa chất chuẩn độ là KOH 1N và HCl 1N. Thí nghiệm ảnh hưởng của pH với 7 công thức và ba lần lặp lại: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0; 8,5. Dùng bình tam giác 250ml có chứa 49 ml môi trường tương ứng, hấp khử trùng ở 121°C, 1atm, 30 phút. Bổ sung vào mỗi bình tam giác 1 ml dung dịch giống đã hoạt hóa.

* Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ

Với môi trường, thời gian nuôi cấy và pH thích hợp. Thí nghiệm với 5 công thức (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C) và 3 lần lặp lại. Dùng bình tam giác 250 ml chứa 49 ml môi trường đã hấp khử trùng ở 121°C, 1atm, 30 phút và bổ sung 1 ml dung dịch giống đã hoạt hóa.

* Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng của các chủng

Điều kiện nuôi cấy khác là tối ưu từ các thí nghiệm trên. Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ lắc với 5 công thức (0, 100, 150, 200, 250 rpm) và 3 lần lặp lại. Dùng bình tam giác 250 ml chứa 49 ml môi trường đã hấp khử trùng ở 121°C, 1atm, 30 phút và bổ sung 1 ml dung dịch giống đã hoạt hóa.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào CFU/ml. Phương pháp theo dõi mật độ tế bào theo phương pháp đo độ đục và đếm khuẩn lạc trên đĩa.

* Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến hoạt tính và mật độ tế bào của chế phẩm probiotics: Thí nghiệm theo dõi mật độ tế bào sống tiến hành định kỳ (một tháng một lần liên tiếp trong 6 tháng), hoà tan 1g chế phẩm trong 100 ml dung dịch nước muối NaCl 0,1% vô trùng rồi pha loãng ở nhiều nồng độ khác nhau (10^{-5} - 10^{-8}) trải 1ml dịch pha loãng lên môi trường dạng đĩa

thạch. Sau 36-48h tiến hành phân tích mật độ vi sinh vật bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc hình thành trên đĩa thạch theo phương pháp của Koch với 3 lần lặp lại. Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào CFU/g.

2.2.5. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm probiotics trong chăn nuôi gà

Thành phần thức ăn của gà đẻ trứng là: bột bắp, lúa nghiền, nước giềng.

Thí nghiệm gồm 3 lô:

Lô thí nghiệm 1: đối chứng (không bổ sung chế phẩm probiotics).

Lô thí nghiệm 2(CT1): bổ sung 0,5g chế phẩm probiotics trong 50kg thức ăn với mật độ $5,3 \times 10^{10}$ CFU/g.

Lô thí nghiệm 3(CT2): bổ sung 1,0g chế phẩm probiotics trong 50kg thức ăn với mật độ $5,3 \times 10^{10}$ CFU/g.

► Mỗi công thức tương ứng với 1 lô và 3 lần lặp lại, số lượng con cho mỗi lô là 500 con.

Các chỉ tiêu theo dõi:

Số lượng trứng: đếm số trứng ở các lô thí nghiệm trên ngày.

Khối lượng trứng: cân trứng ở mỗi lô thí nghiệm theo ngày (kg/300 quả trứng).

Số con gà bị nhiễm bệnh: đếm trên từng lô theo ngày.

2.2.6. Phương pháp xử lý thống kê

Các số liệu được xử lý thống kê theo phần mềm MSTATC version 2.10 của Đại học bang Michigan. Các số liệu được phân tích ANOVA và được trắc nghiệm phân hạng LSD value với mức ý nghĩa 0,01 và 0,05.

Đồ thị và phương trình tương quan giữa chỉ số mật độ quang OD và số khuẩn lạc trên đĩa được xử lý trên phần mềm EXCEL 2003 của Microsoft, các biểu đồ khác cũng được xử lý trên phần mềm này.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu mô tả đặc điểm sinh học của một số chủng vi sinh probiotics

3.1.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi sinh probiotics

Để mô tả đặc điểm sinh học của các chủng, chúng tôi sử dụng môi trường tối thiểu để nuôi cấy: MT Cao thịt-peptone (*B.subtilis*), MT MRS (*L.acidophilus*), MT Hansen (*S.cerevisiae*), MT Winogradski I (*Nitrosomonas* sp.).

Quan sát hình thái của khuẩn lạc và hình thái tế bào của vi sinh vật.

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 4 chủng vi sinh probiotics được mô tả ở bảng 3.1.

Bảng 3.1: Hình thái khuẩn lạc của 4 chủng vi sinh vật

Các chủng	Hình thái khuẩn lạc sau 48h nuôi cấy									
	Hình dạng	Kích thước	ĐT QH	Màu sắc	MC N	Bề mặt	Độ đặc	Cấu trúc	E. catalase	Thử màu với diphenyl amine
<i>Bacillus subtilis</i>	Tròn	1,5 mm	Đục	Trắng ngà	Lồi	Tron	Nhớt	Hạt nhỏ	+	Không màu
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Tròn	2,5 mm	Đục	Trắng	Lồi	Tron	Nhớt	Hạt lớn	-	Không màu
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tròn	3mm	Đục	Trắng	Ăn vào thạch	Gồ ghề	Bột nhão	Hạt lớn	-	Không màu
<i>Nitrosomonas</i> sp.	Tròn	0,5 mm	Đục	Trắng bạc	Lồi	Tron	Nhớt	Hạt nhỏ	-	Xanh thẫm

3.1.2. Đặc điểm sinh học của các chủng vi sinh probiotics

Bốn chủng vi sinh probiotics được cấy ria trên đĩa peptri. Sau 36-48h làm tiêu bản để quan sát trên kính hiển vi. Tiêu bản tế bào được quan sát ở vật kính 40×, 100×.

Bảng 3.2: Hình thái tế bào của 4 chủng vi sinh probiotics

Chủng	Hình thái tế bào sau 48h nuôi cấy	
	Hình dạng	Kích thước
<i>B. subtilis</i>	Hình que	3-4 μm
<i>L. acidophilus</i>	Hình que	6-7 μm
<i>S. cerevisiae</i>	Hình ovan	5-6 $\mu\text{m} \times 2-3 \mu\text{m}$
<i>Nitrosomonas</i> sp.	Hình que	4-5 μm

3.1.3. Môi trường quan giữa độ đục (chỉ số OD) và số lượng tế bào (CFU/ml)

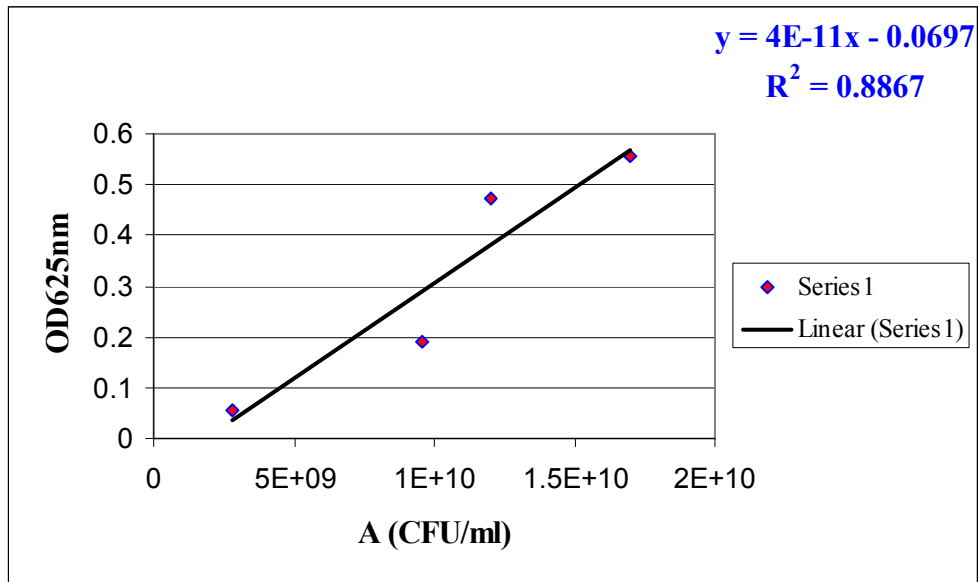
Trong nghiên cứu này, theo dõi mật độ tế bào theo phương pháp đo độ đục và đếm khuẩn lạc trên đĩa. Do đó việc dựng đường chuẩn và phương trình tương quan giữa chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) là cần thiết cho các đánh giá sau này cũng như có thể so sánh kết quả của nghiên cứu này với các nghiên cứu khác.

- Thí nghiệm kiểm tra mật độ tế bào theo thời gian sinh trưởng của *B.subtilis* bởi phương pháp đo độ đục và đếm khuẩn lạc trên đĩa. Nuôi cấy và kiểm tra mật độ theo thời gian 12h, 24h, 36h và 48h. Kết quả được thể hiện qua bảng 3.3.

Bảng 3.3: Chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) *B.subtilis*

Thời gian (h)	OD _{625nm}	Số lượng tế bào (CFU/ml)
12	0,056	$2,8 \times 10^9$
24	0,190	$9,6 \times 10^9$
36	0,471	$1,2 \times 10^{10}$
48	0,559	$1,7 \times 10^{10}$

Đường chuẩn và phương trình tương quan giữa chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) được thể hiện qua đồ thị 3.1.



Đồ thị 3.1: Đường tương quan tuyến tính giữa A(CFU/ml) và OD625nm của *B.subtilis*

Theo đồ thị 3.1, phương trình tương quan giữa chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) là:

$$y = 4E-11x - 0,0697$$

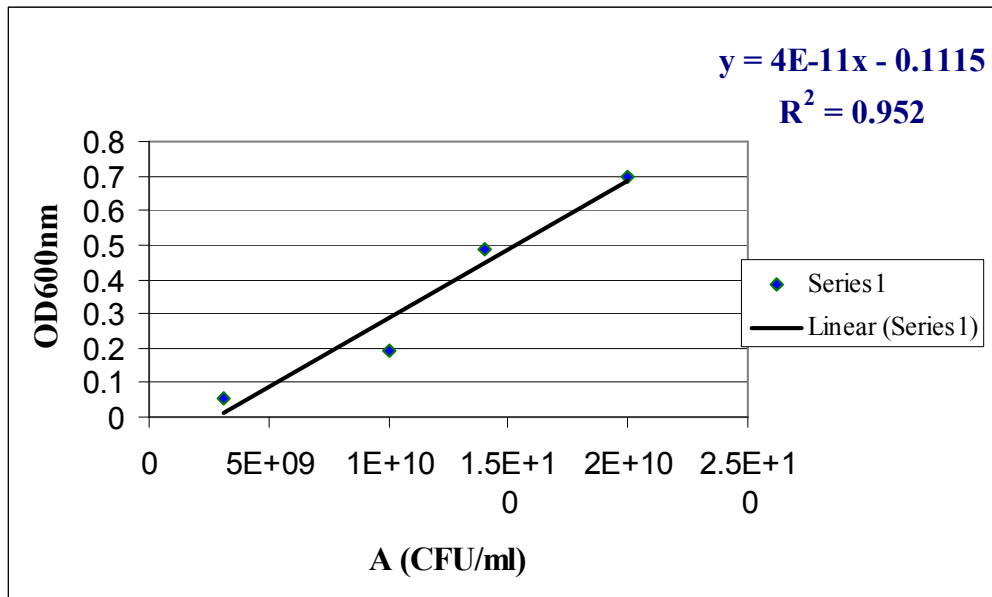
Trong đó: x là số lượng tế bào (CFU/ml).

y là chỉ số OD.

- Tương tự cũng xây dựng được đường tương quan tuyến tính giữa chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) của *L.acidophilus* theo thời gian sinh trưởng. Kết quả thu được ở bảng 3.4 và đồ thị 3.2.

Bảng 3.4: Chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) *L.acidophilus*

Thời gian (h)	OD _{600nm}	Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)
12	0,054	$3,1 \times 10^9$
24	0,194	$1,0 \times 10^{10}$
36	0,485	$1,4 \times 10^{10}$
48	0,700	$2,0 \times 10^{10}$



Đồ thị 3.2: Đường tương quan tuyến tính giữa A (CFU/ml) và OD_{600nm} của *L.acidophilus*

Theo đồ thị 3.2, phương trình tương quan giữa chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) là:

$$y = 4E-11x - 0,1115$$

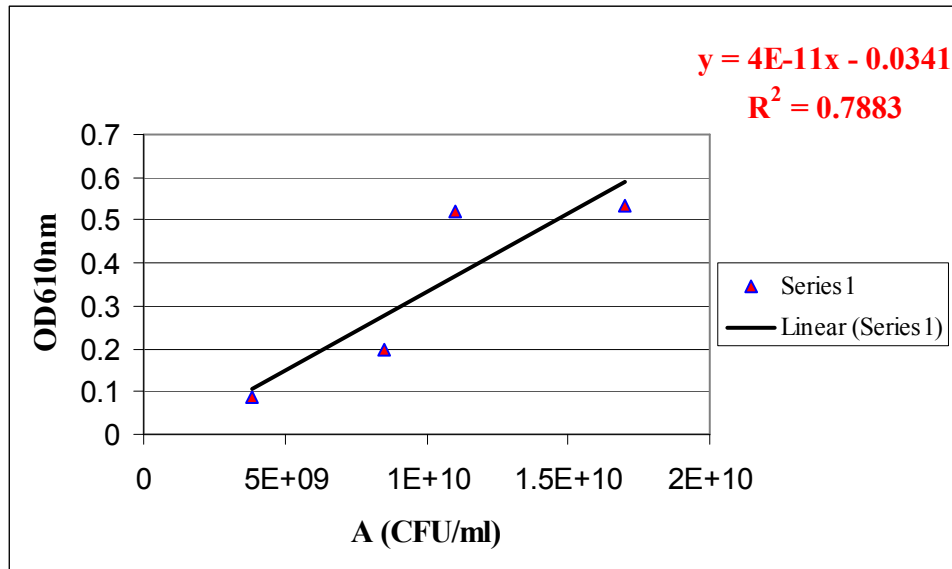
Trong đó: x là số lượng tế bào (CFU/ml).

y là chỉ số OD.

- Thí nghiệm kiểm tra mật độ tế bào của *S.cerevisiae* cũng được tiến hành theo phương pháp đo độ đục và đếm khuẩn lạc trên đĩa, tương tự chúng tôi thu được kết quả bảng 3.5.

Bảng 3.5: Chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) *S.cerevisiae*

Thời gian (h)	OD_{610nm}	Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)
12	0,089	$3,8 \times 10^9$
24	0,196	$8,5 \times 10^9$
36	0,521	$1,1 \times 10^{10}$
48	0,536	$1,7 \times 10^{10}$



Đồ thị 3.3: Đường tương quan tuyến tính giữa $A(\text{CFU/ml})$ và $\text{OD}_{610\text{nm}}$ của *S.cerevisiae*

Theo đồ thị 3.3, phương trình tương quan giữa chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) là:

$$y = 4E-11x - 0,0341$$

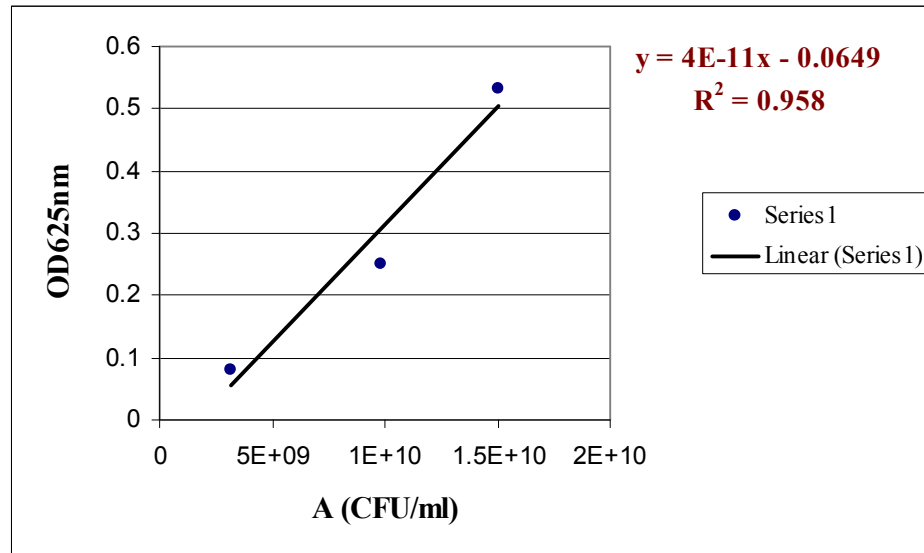
Trong đó: x là số lượng tế bào (CFU/ml).

y là chỉ số OD.

- Đối với *Nitrosomonas* sp. cũng được tiến hành tương tự nhưng được theo dõi ở 12h, 24h và 36h. Kết quả thu được ở bảng 3.6.

Bảng 3.6: Chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) *Nitrosomonas* sp.

Thời gian (h)	$\text{OD}_{625\text{nm}}$	Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)
12	0,080	$3,2 \times 10^9$
24	0,252	$9,8 \times 10^9$
36	0,533	$1,5 \times 10^{10}$



Đồ thị 3.4: Đường tương quan tuyến tính giữa A (CFU/ml) và OD625nm của *Nitrosomonas sp.*

Theo đồ thị 3.4, phương trình tương quan giữa chỉ số OD và số lượng tế bào (CFU/ml) là:

$$y = 4E-11x - 0,0649$$

Trong đó: x là số lượng tế bào (CFU/ml).

y là chỉ số OD.

3.2. Nghiên cứu quy trình lên men các chủng vi sinh probiotics và tạo chế phẩm probiotics

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics

Để có cơ sở khoa học cho việc giữ giống, nghiên cứu quy trình sản xuất và sử dụng các chế phẩm vi sinh, cần phải nắm rõ các đặc điểm sinh học và nguồn dinh dưỡng cần thiết của các chủng. Các nguồn dinh dưỡng khác nhau đều ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Vì vậy, tiến hành nuôi cấy các chủng VSV trên các môi trường khác nhau để tìm môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng.

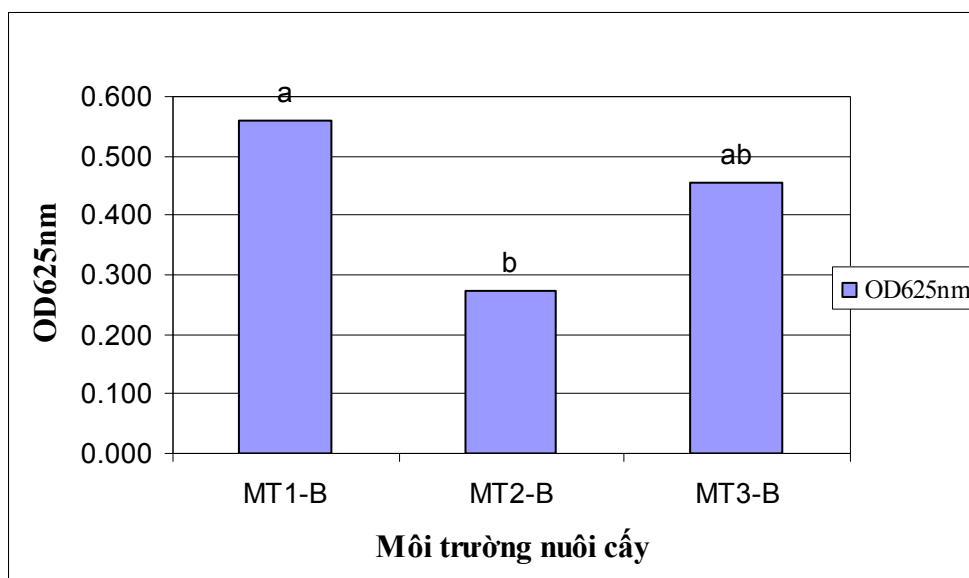
- *B. subtilis* được nuôi trên 3 môi trường để xác định môi trường nào vi khuẩn này phát triển tốt cho việc nhân sinh khối tế bào. Các thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ phòng 28-30°C và đặt trên máy lắc 200 vòng/phút, thời gian nuôi cấy 48h. Sau đó lấy dung dịch nuôi cấy đo OD ở bước sóng 625nm để xác định mật độ tế bào, kết quả được trình bày ở bảng 3.7.

Bảng 3.7: Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sinh trưởng của *B.subtilis*

Môi trường nuôi cấy <i>Bacillus subtilis</i> (OD _{625nm})	3 lần lặp lại	MT1-B	MT2-B	MT3-B
	L1	0,569	0,272	0,457
	L2	0,593	0,262	0,403
	L3	0,511	0,281	0,489
	TB	0,558 ^a	0,272 ^b	0,450 ^{ab}
	CV%	9,98		

(Các trị số a, b, ab trên cùng một hàng có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy thành phần môi trường đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của chúng, thể hiện trong biểu đồ 3.1:



Biểu đồ 3.1: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của *B.subtilis*

Qua biểu đồ cho thấy, *B. subtilis* phát triển trên các môi trường khác nhau, nhưng không phải nguồn nitơ nào cũng thích hợp cho vi khuẩn phát triển. Vì vậy, xác định nguồn nitơ cho nuôi cấy VSV là rất cần thiết. Trong trường hợp này mật độ tế bào ở môi trường MT1-B (0,558) cao hơn so với 2 môi trường kia có thể do nguyên nhân là sự tổ hợp các hoá chất ở môi trường MT1-B thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của *B. subtilis* hơn là tổ hợp các hoá chất trong môi trường MT2-B và MT3-B. Chính lí do này, đã chọn được môi trường thuận lợi giúp cho *B. subtilis* tăng nhanh về sinh khối.

Dựa vào kết quả thu được chọn MT1-B là môi trường thích hợp cho việc nuôi cấy và thu sinh khối. Chúng tôi sử dụng môi trường này ở các nghiên cứu tiếp theo.

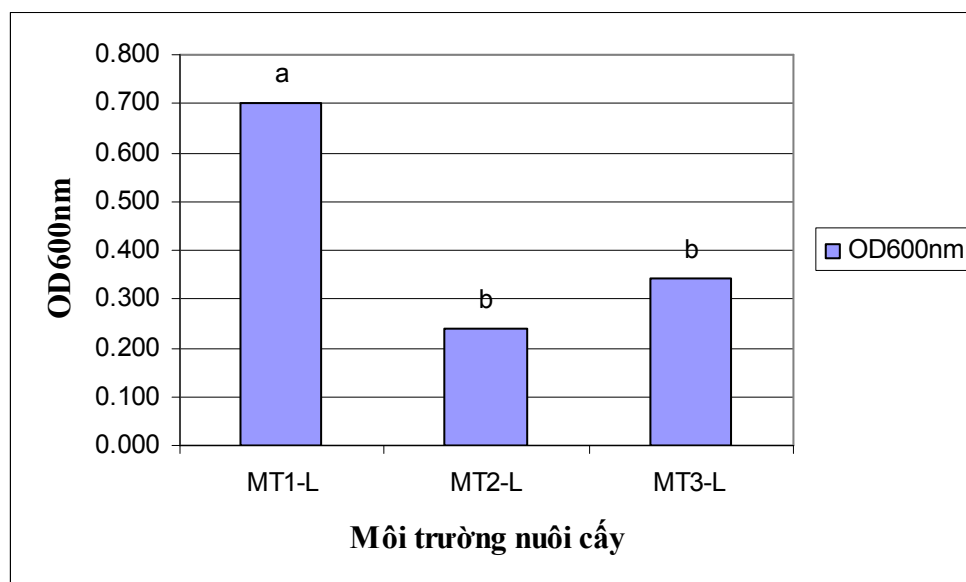
- Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sinh trưởng của *L.acidophilus* để xác định môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Thí nghiệm được thực hiện trên 3 môi trường khác nhau, nhiệt độ phòng 28-30°C và đặt trên máy lắc 150 vòng/phút, sau 48h lấy dung dịch nuôi cấy đo OD ở bước sóng 600 nm để xác định mật độ tế bào, kết quả thu được ở bảng 3.8.

Bảng 3.8: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng *L.acidophilus*

Môi trường nuôi cấy <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> (OD _{600nm})	3 lần lặp lại	MT1-L	MT2-L	MT3-L
	L1	0,691	0,224	0,325
L2	0,684	0,269	0,374	
L3	0,724	0,220	0,326	
TB	0,700 ^a	0,238 ^b	0,342 ^b	
CV%	6,05			

(Các trị số a, b trên cùng một hàng có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Từ kết quả bảng 3.8 chúng ta xây dựng được biểu đồ 3.2:



Biểu đồ 3.2: Ảnh hưởng của MT nuôi cấy đến sinh trưởng của *L.acidophilus*

Qua biểu đồ 3.2 cho thấy *L.acidophilus* phát triển trên các môi trường khác nhau, nhưng tốt nhất là môi trường MT1-L (0,700) với mật độ tế bào cao hơn so với 2 môi trường còn lại là MT2-L (0,238) và MT3-L (0,342). Vì thế, sử dụng môi trường MT1-L cho các nghiên cứu sau.

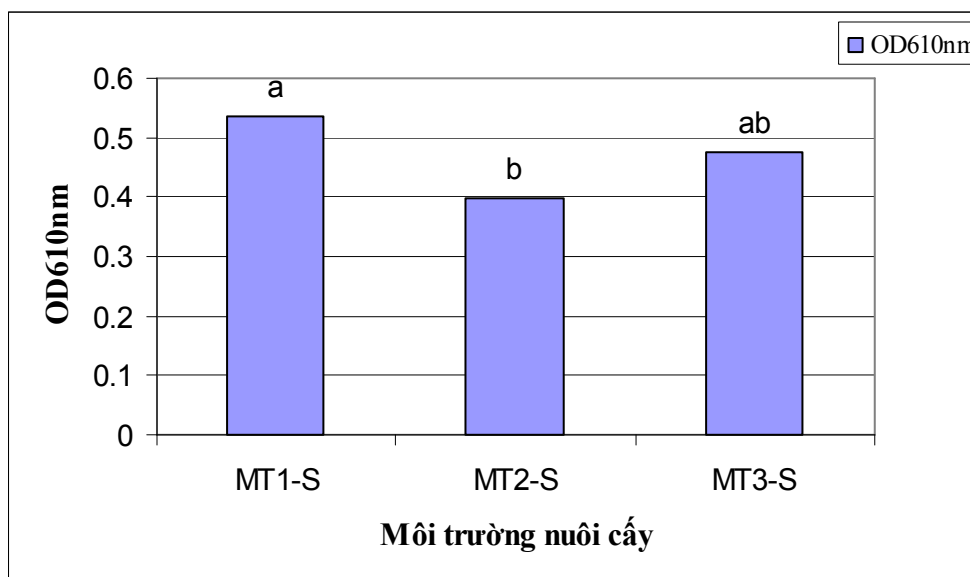
- *S. cerevisiae* cũng được nghiên cứu trên 3 môi trường khác nhau nguồn cacbon để tìm môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của chúng. Thí nghiệm tiến hành trên 3 môi trường, ở nhiệt độ phòng 28-30°C và tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian 48h. Sau đó lấy dịch nuôi cấy đo OD ở bước sóng 610 nm để xác định mật độ tế bào, kết quả được trình bày ở bảng 3.9.

Bảng 3.9: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của *S.cerevisiae*

Môi trường nuôi cấy	3 lần lặp lại	MT1-S	MT2-S	MT3-S
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (OD _{610nm})	L1	0,549	0,400	0,455
	L2	0,550	0,399	0,482
	L3	0,510	0,398	0,488
	TB	0,536 ^a	0,399 ^b	0,475 ^{ab}
	CV%	4,03		

(Các trị số a, b, ab trên cùng một hàng có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Kết quả bảng 3.9 được thể hiện qua biểu đồ 3.3:



Biểu đồ 3.3: Ảnh hưởng của thành phần MT đến sinh trưởng của *S.cerevisiae*

Biểu đồ 3.3 cho thấy *S.cerevisiae* đều phát triển trên các môi trường, nhưng mật độ tế bào ở môi trường MT1-S với nguồn cacbon là glucose đạt cao nhất (0,536). Điều này chứng tỏ nguồn cacbon ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm men. Vì thế chọn môi trường MT1-S là thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của *S.cerevisiae*. Kết quả này trùng với kết quả nghiên cứu của Renata G. K. Leuschner (2004) là *S.cerevisiae* sử dụng nguồn cacbon là glucose [53].

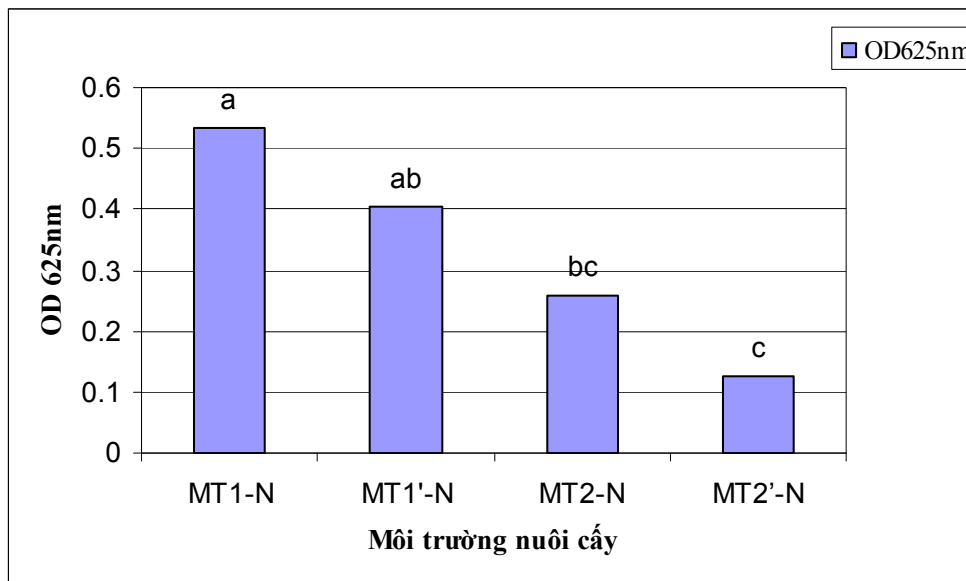
- Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của *Nitrosomonas* sp. được tiến hành trên 4 môi trường khác nhau nhằm xem thành phần và khối lượng của các hoá chất ảnh hưởng như thế nào đến sự sinh trưởng của chúng. Sau 36h, đo OD của dung dịch nuôi cấy ở bước sóng 625nm để xác định mật độ tế bào, kết quả được trình bày ở bảng 3.10.

Bảng 3.10: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của *Nitrosomonas* sp.

Môi trường nuôi cấy <i>Nitrosomonas</i> sp. (OD _{625nm})	3 lần lặp lại	MT1-N	MT1'-N	MT2-N	MT2'-N
	L1	0,538	0,416	0,237	0,145
	L2	0,520	0,410	0,291	0,101
	L3	0,541	0,383	0,248	0,129
	TB	0,533 ^a	0,403 ^{ab}	0,259 ^{bc}	0,125 ^c
	CV%	7,07			

(Các trị số a, ab, bc, c trên cùng một hàng có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Kết quả bảng 3.10 thể hiện qua biểu đồ 3.4:



Biểu đồ 3.4: Ảnh hưởng của MT nuôi cấy đến sinh trưởng của *Nitrosomonas* sp.

Qua biểu đồ 3.4 cho thấy *Nitrosomonas* sp. có khả năng sinh trưởng trên các môi trường khác nhau, nhưng mật độ tế bào ở môi trường MT1-N (0,533) cao hơn so với 3 môi trường còn lại. Điều này chứng tỏ thành phần và khối lượng của các hoá chất trong môi trường đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chúng.

Dựa vào kết quả thu được cho thấy *Nitrosomonas* sp. sinh trưởng tốt trong môi trường MT1-N. Vì thế môi trường này được dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics

Mỗi loài vi sinh vật sinh trưởng, phát triển theo một quy luật nhất định. Chính vì thế, khi nghiên cứu cần nắm rõ quá trình này để xác định các thời điểm thích hợp cho các công đoạn tiếp theo. Thí nghiệm được tiến hành trên các môi trường tối ưu, nhiệt độ phòng 28-30°C, độ lắc tương ứng của các chủng với các khoảng thời gian nuôi cấy 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h và 96h.

Trong khoảng thời gian nuôi cấy, tiến hành đo độ đục (OD) của các chủng ở bước sóng tương ứng để xác định mật độ tế bào theo thời gian.

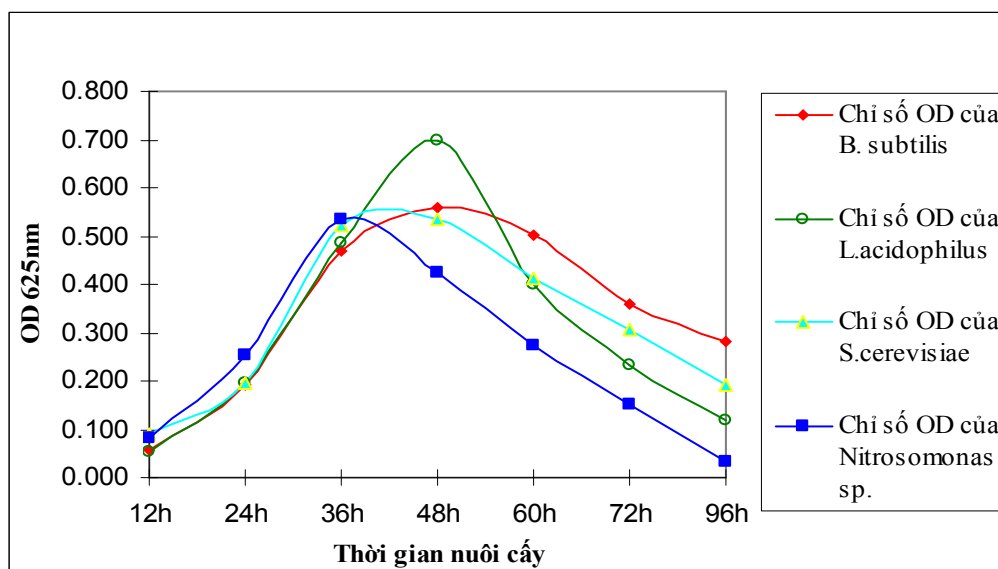
Theo kết quả thu được ở bảng 3.11, thời gian phát triển tối ưu của các chủng là *B. subtilis* (48h), *L.acidophilus* (48h), *S.cerevisiae* (48h), *Nitrosomonas* sp. (36h). Trước thời điểm này mật độ tế bào của các chủng tăng nhẹ và sau đó mật độ giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Ở *B. subtilis*, mật độ tế bào sau 12h nuôi cấy là 0,056; đến 24h mật độ của chúng tăng đạt 0,190 và 36h mật độ của chúng đã tăng lên nhanh chóng là 0,471; đến 48h mật độ của chúng đã đạt cực đại là 0,559; sau đó mật độ tế bào của chúng đã giảm nhẹ ở 60h còn 0,503 và đến 72h, 96h thì mật độ bắt đầu giảm mạnh. Tương tự đối với chủng *L.acidophilus* mật độ tế bào sau 12h nuôi cấy là 0,054; đến 24h mật độ tăng lên 0,194 và 36h mật độ tăng lên nhanh chóng là 0,485 và đến 48h mật độ tế bào đạt cực đại 0,700; sau đó mật độ giảm nhẹ 60h còn 0,400 và bắt đầu giảm mạnh đến 96h chỉ còn 0,118. *S.cerevisiae* thì mật độ tế bào cũng tăng nhẹ lúc 12h, 24h, đến 36h mật độ tăng mạnh là 0,521 và đạt cực đại 48h là 0,536; sau đó mật độ tế bào giảm dần và đến 96h chỉ còn 0,192. Còn *Nitrosomonas* sp. Mật độ tế bào sau 12h, 24h nuôi cấy lần lượt là 0,080; 0,252 và nhanh chóng đạt cực đại ở 36h là 0,533; sau đó mật độ tế bào giảm và đến

96h còn 0,034. Ta có đồ thị đường cong sinh trưởng của các chủng vi sinh vật được thể hiện qua đồ thị 3.5.

Bảng 3.11: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng

Thời gian nuôi cấy	Chỉ số OD của các chủng			
	<i>B. subtilis</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>Nitrosomonas</i> sp.
12h	0,056 ^c	0,054 ^c	0,089 ^c	0,080 ^c
24h	0,190 ^{bc}	0,194 ^{bc}	0,196 ^{bc}	0,252 ^{abc}
36h	0,471 ^{ab}	0,485 ^{ab}	0,521 ^a	0,533 ^a
48h	0,559 ^a	0,700 ^a	0,536 ^a	0,424 ^{ab}
60h	0,503 ^a	0,400 ^{abc}	0,411 ^{ab}	0,273 ^{abc}
72h	0,359 ^{abc}	0,231 ^{bc}	0,307 ^{abc}	0,152 ^{bc}
96h	0,282 ^{abc}	0,118 ^{bc}	0,192 ^{bc}	0,034 ^c
CV%	5,70	4,42	5,10	4,37

(Các trị số có các chữ cái giống nhau ở cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)



Đồ thị 3.5: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng

Qua đồ thị nhận thấy rằng sự sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh vật nuôi cấy trong môi trường dịch thể trải qua 4 pha là:

Pha tiềm phát (lag): Pha này được tính từ lúc bắt đầu cấy vi sinh vật vào bình cho đến khi chúng bắt đầu sinh trưởng. Trong pha này số lượng VSV chưa nhiều do lúc này tế bào mới bắt đầu tăng về trọng lượng và thể tích, đồng thời trong pha này chúng phải tổng hợp ADN và các enzyme cần thiết cho sự phân bào.

Pha tích lũy (log): Trong giai đoạn này, VSV tăng nhanh về trọng lượng đồng thời lớn nhanh về kích thước, chúng tổng hợp mạnh mẽ những chất cần thiết cho quá trình sinh trưởng và phát triển.

Pha cân bằng: Trong pha này tốc độ sinh trưởng và trao đổi chất của VSV giảm dần, số lượng tế bào đạt cực đại đã đi vào ổn định dần về hình thái, số lượng tế bào sinh ra cân bằng với số lượng tế bào chết đi. VSV chuyển sang pha cân bằng bởi một số nguyên nhân như chất dinh dưỡng bắt đầu cạn kiệt, pH thay đổi, chất độc tích lũy,....

Pha suy vong: Số lượng tế bào chết vượt trội số lượng tế bào mới được tạo thành nguyên nhân do chất dinh dưỡng cạn kiệt, chất độc hại tích lũy nhiều....

Như vậy, sau 36h-48h mật độ tế bào đạt cực đại và bắt đầu đi vào giai đoạn ổn định cho nên với mục đích thu sinh khối tế bào sẽ tiến hành vào thời điểm này.

3.2.3. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics

Giới hạn pH thích ứng của từng loại VSV rất khác nhau. Một số chủng VSV có thể phát triển trong môi trường acid, môi trường trung tính hoặc môi trường kiềm cho nên việc xác định pH thích hợp đối với các chủng vi sinh vật là cần thiết.

Bên cạnh đó, nồng độ các ion H^+ và OH^- ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trao đổi chất của tế bào, làm ảnh hưởng đến diện tích bề mặt và mức độ

hoà tan của một số muối khoáng. Ngoài ra, pH của môi trường còn ảnh hưởng đến các sản phẩm hoạt động sống của VSV và đến quá trình sinh trưởng, phát triển của chúng, cho nên xác định pH thích hợp cho quá trình nhân nuôi VSV là rất quan trọng.

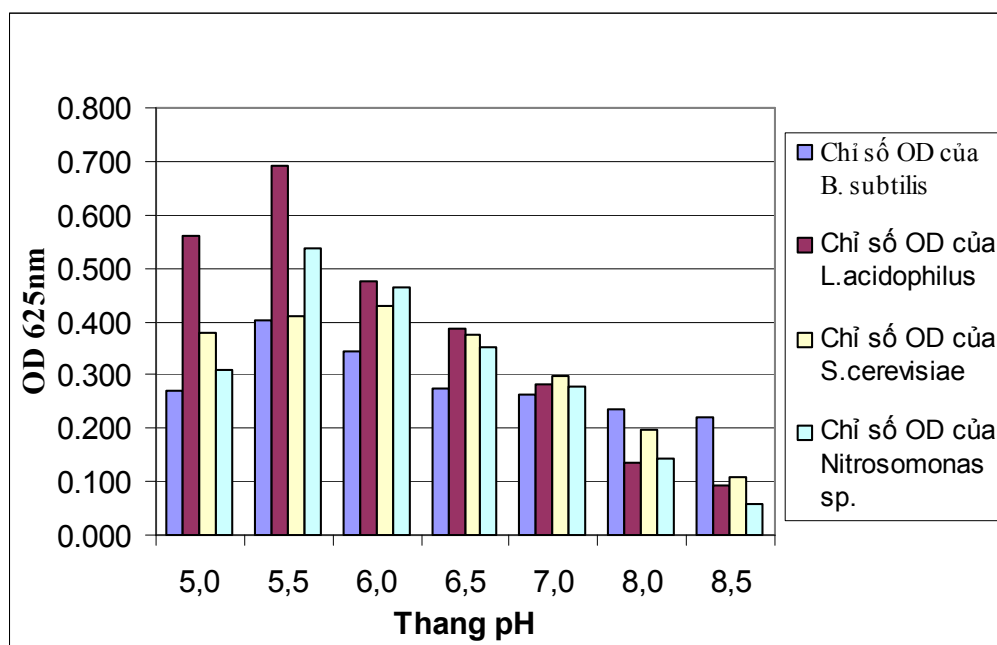
Để nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng VSV, tiến hành nuôi cấy với 7 mức pH khác nhau: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0; 8,5. Thí nghiệm được tiến hành ở môi trường, nhiệt độ và tốc độ lắc thích hợp. Sau 36-48h nuôi cấy, đo OD của dịch nuôi cấy ở các bước sóng tương ứng, kết quả được trình bày ở bảng 3.12.

Bảng 3.12: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các chủng

Thang pH	Chỉ số OD của các chủng			
	<i>B. subtilis</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>Nitrosomonas sp.</i>
5,0	0,270 ^{bc}	0,559 ^{ab}	0,377 ^{ab}	0,308 ^{abc}
5,5	0,402 ^a	0,691 ^a	0,408 ^a	0,538 ^a
6,0	0,343 ^{ab}	0,476 ^{abc}	0,430 ^a	0,462 ^a
6,5	0,276 ^{bc}	0,385 ^{abcd}	0,375 ^{ab}	0,350 ^{ab}
7,0	0,263 ^{bc}	0,282 ^{bcd}	0,298 ^{abc}	0,277 ^{abc}
8,0	0,234 ^c	0,137 ^{cd}	0,196 ^{bc}	0,144 ^{bc}
8,5	0,220 ^c	0,093 ^d	0,108 ^c	0,058 ^c
CV%	7,16	2,45	3,50	5,94

(Các trị số có các chữ cái giống nhau ở cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Từ bảng 3.12 xây dựng biểu đồ 3.5 về ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các chủng.



Biểu đồ 3.5: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng các chủng

Qua biểu đồ 3.5 cho thấy pH có ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng, phát triển của các chủng VSV. Cụ thể là mật độ tế bào *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp. Đạt cực đại ở pH=5,5 đến pH=6,0; riêng *L. acidophilus* đạt cực đại ở pH=5,0 đến 5,5 kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Irena Rogelj (2002)[31]; ngoài khoảng đó mật độ giảm dần.

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả khác là các chủng này sinh trưởng, phát triển tốt ở môi trường có pH hơi acid từ 5,0 đến 6,0.

3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics

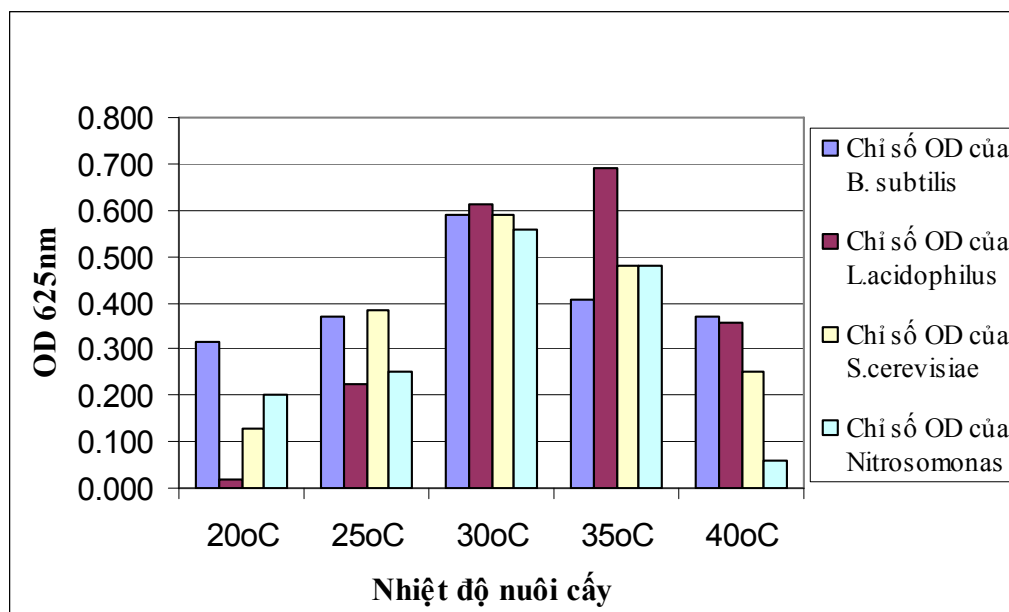
Mỗi VSV có một ngưỡng nhiệt độ phát triển tối ưu, vì thế nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và phát triển của các chủng là cần thiết. Nhiệt độ ảnh hưởng rõ rệt đến các hoạt động sống của tế bào VSV ở 5 thang nhiệt độ (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C) với môi trường và pH tối ưu. Thí nghiệm được đo OD sau 36-48h để xác định mật độ tế bào, kết quả được ghi nhận ở bảng 3.13.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng

Nhiệt độ nuôi cấy	Chỉ số OD của các chủng			
	<i>B. subtilis</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>Nitrosomonas</i> sp.
20°C	0,316 ^b	0,017 ^b	0,126 ^b	0,202 ^b
25°C	0,370 ^b	0,224 ^{ab}	0,382 ^{ab}	0,253 ^b
30°C	0,590 ^a	0,613 ^a	0,590 ^a	0,556 ^a
35°C	0,405 ^{ab}	0,689 ^a	0,482 ^{ab}	0,479 ^a
40°C	0,372 ^b	0,358 ^{ab}	0,251 ^{ab}	0,058 ^a
CV%	2,84	2,93	3,72	4,04

(Các trị số có các chữ cái giống nhau ở cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Từ bảng 3.13 xây dựng được biểu đồ 3.6 ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng.



Biểu đồ 3.6: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng các chủng

Qua kết quả thống kê và biểu đồ cho thấy, các chủng VSV sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 30-35°C, ngoài giới hạn này thì không thuận lợi cho sự sinh

trường của chúng. Kết quả này cũng góp phần giúp bảo quản chế phẩm một cách tốt nhất để đảm bảo mật độ VSV.

Irena Rogelj (2002), nghiên cứu nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng của *L.acidophilus* là 30 – 37°C[31]. Renata G. K. Leuschner (2004) *S.cerevisiae* sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 30-35°C [53].

3.2.5. Ảnh hưởng của độ lắc đến sinh trưởng của các chủng vi sinh probiotics

Các chủng VSV cần oxy để có thể tiến hành quá trình hô hấp, trao đổi chất, trao đổi năng lượng với môi trường bên ngoài. Vì vậy, hàm lượng oxy trong môi trường sống có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của chúng.

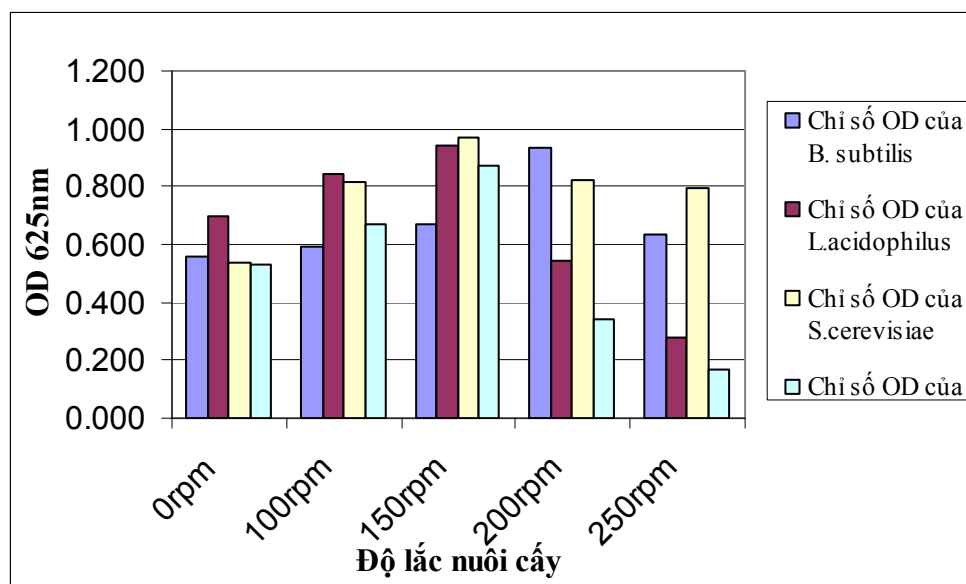
Thí nghiệm này VSV được nuôi cấy ở môi trường dịch thể, môi trường này hạn chế việc sử dụng oxy nên khi nhân nuôi các bình nuôi cấy được lắc ở các tốc độ khác nhau để cung cấp oxy hoà tan. Thí nghiệm được thực hiện với 5 tốc độ lắc (0, 100, 150, 200, 250 vòng/phút). Sau 36-48h, tiến hành đo OD để xác định mật độ tế bào VSV trong dịch nuôi cấy, kết quả được ghi nhận ở bảng 3.14.

Bảng 3.14: Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng của các chủng

Tốc độ lắc (rpm)	Chỉ số OD của các chủng			
	<i>B. subtilis</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>Nitrosomonas sp.</i>
0	0,558 ^b	0,700 ^{ab}	0,536 ^b	0,533 ^b
100	0,596 ^b	0,845 ^a	0,813 ^{ab}	0,669 ^b
150	0,672 ^{ab}	0,942 ^a	0,970 ^a	0,869 ^a
200	0,933 ^a	0,547 ^{ab}	0,823 ^{ab}	0,342 ^c
250	0,633 ^{ab}	0,279 ^b	0,798 ^{ab}	0,165 ^c
CV%	3,21	1,69	1,47	2,53

(Các trị số có các chữ cái giống nhau ở cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Từ bảng 3.14 xây dựng biểu đồ 3.7 về ảnh hưởng của tốc độ lắc đến mật độ tế bào của các chủng VSV. Ta thấy mật độ của các chủng VSV tăng dần theo tốc độ lắc và đạt cực đại ở 200 vòng/phút (*B. subtilis*) và 150 vòng/phút (*L.acidophilus*, *S.cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp.).



Biểu đồ 3.7: Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng của các chủng

Như vậy các chủng VSV khi được cung cấp oxy sẽ làm tăng khả năng trao đổi giữa cơ thể với môi trường bên ngoài giúp VSV thuận lợi trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Từ đó dẫn đến sinh khối của chúng gia tăng. Mặt khác, khi nhân nuôi trong môi trường dịch thể đã hạn chế sự tiếp xúc giữa VSV và oxy, nên khi lắc các bình nuôi cấy sẽ làm tăng khả năng hoà tan hàm lượng oxy trong dung dịch, VSV càng có nhiều oxy cho quá trình hô hấp, sinh trưởng và phát triển. Vì vậy, ở tốc độ lắc 150-200 vòng/phút thì mật độ VSV đạt cao nhất khi khảo sát. Tuy nhiên, tốc độ lắc cũng có một giới hạn nhất định cho nên cần nghiên cứu ở các tốc độ lắc khác cho phù hợp với mục đích và điều kiện khảo sát.

3.2.6. Xây dựng quy trình tạo chế phẩm probiotics

Từ kết quả của các thí nghiệm trên và qua phân tích thảo luận, đã xác định được điều kiện nuôi cấy thích hợp cho các chủng vi sinh probiotics với mục đích thu sinh khối tế bào hấp phụ lên bột là:

Môi trường nuôi cấy của *B. subtilis* là MT1-B, *L.acidophilus* là MT1-L, *S.cerevisiae* (MT1-S), *Nitrosomonas* sp.(MT1-N).

Thời gian để thu sinh khối của *B. subtilis*, *L.acidophilus*, *S.cerevisiae* là 48h, *Nitrosomonas* sp. Là 36h.

Ph thích hợp để nuôi cấy là *B. subtilis*, *S.cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp. Là 5,5-6,0; riêng *L.acidophilus* là 5,0-5,5.

Nhiệt độ tối ưu của các chủng là 30-35⁰C.

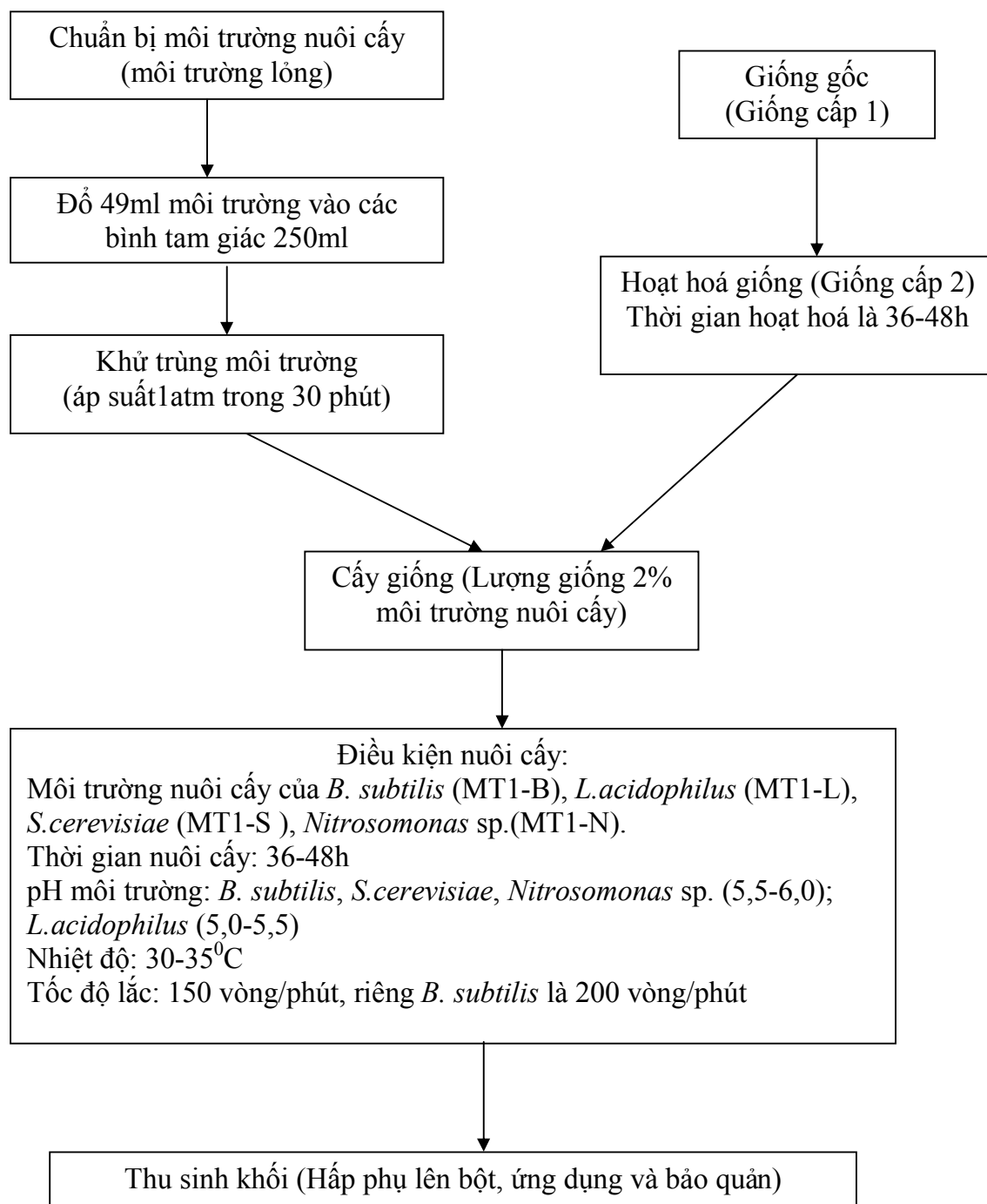
Tốc độ lắc để đạt sinh khối của *B. subtilis* là 200 vòng/phút; *L.acidophilus*, *S.cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp. Là 150 vòng/phút.

Trong quá trình nuôi cấy để thu được sinh khối tế bào cao nhất và tránh lãng phí, cần chọn thời điểm thu phù hợp để hấp phụ lên bột.

Thu sinh khối vi sinh ở dạng lỏng và hấp phụ lên bột với tỉ lệ 1 lít dịch vi sinh + 1 kg bột mì khô. Dịch vi sinh được phun đều lên bột và để khô ở nhiệt độ 30-35⁰C. Sau đó đóng gói, bảo quản và ứng dụng cho gà đẻ trứng. Trộn chế phẩm với thức ăn của gà theo ngày.

Từ kết quả của các thí nghiệm, xây dựng một quy trình nuôi cấy nhân sinh khối với quy mô nhỏ (như nghiên cứu trong phòng thí nghiệm) các chủng vi sinh probiotics, đạt hiệu quả cao nhất qua sơ đồ:

Sơ đồ: Tóm tắt quy trình nuôi cấy nhân sinh khối các chủng vi sinh probiotics.



3.3. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến mật độ VSV của chế phẩm

Để dễ dàng trong việc bảo quản, vận chuyển và sử dụng, người ta thường phối trộn VSV với chất mang. Sau khi tăng sinh trong môi trường tối ưu, VSV được trộn đều với chất mang, chất mang phải khô và nhuyễn. Vật liệu làm chất mang phải dễ tìm, rẻ, và có số lượng lớn để không ảnh hưởng đến quá trình sản xuất.

Chất mang là bột khoai mì để hấp phụ các chủng vi sinh probiotics (bột khoai mì ngoài chức năng cung cấp cacbonhydrat còn có vai trò là chất kết dính). Sinh khối VSV phối trộn vào chất mang ở dạng dịch lỏng. Sau khi phối trộn hỗn hợp được sấy ở nhiệt độ 30-35°C.

Khi tạo ra một chế phẩm thì thời gian đảm bảo chất lượng là rất quan trọng tức là vẫn đảm bảo số lượng VSV cần thiết. Nên vấn đề đặt ra ở đây là chúng ta phải theo dõi mật độ VSV trong chế phẩm theo thời gian. Tiến hành nuôi cấy chúng trên môi trường và các điều kiện khác tối ưu của từng chủng. Thí nghiệm tiến hành định kỳ (một tháng một lần liên tiếp trong 6 tháng), hoà tan 1g chế phẩm trong 100 ml dung dịch nước muối NaCl 0,1% vô trùng rồi pha loãng ở nhiều nồng độ khác nhau (10^{-5} - 10^{-8}) trải 1ml dịch pha loãng lên môi trường dạng đĩa thạch. Sau 36-48h tiến hành phân tích mật độ vi sinh vật bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc hình thành trên đĩa thạch theo phương pháp của Koch. Áp dụng công thức tính mật độ tế bào để xác định sự sinh trưởng của các chủng, kết quả được trình bày ở bảng 3.15.

Bảng 3.15: Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến sinh trưởng của các chủng

Thời gian Chủng	Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/g)					
	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4	Tháng 5	Tháng 6
<i>B.subtilis</i>	$1,5 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	$9,0 \times 10^9$	$7,3 \times 10^9$	$5,9 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$
<i>L. acidophilus</i>	$1,4 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$	$9,7 \times 10^9$	$7,9 \times 10^9$	$5,6 \times 10^9$	$4,1 \times 10^9$
<i>S. cerevisiae</i>	$1,3 \times 10^{10}$	$9,3 \times 10^9$	$8,2 \times 10^9$	$5,6 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$
<i>Nitrosomonas</i> sp.	$1,1 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^9$	$8,1 \times 10^9$	$6,4 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$

Từ kết quả thu được sẽ dễ dàng điều chỉnh lượng VSV phối trộn vào chất mang và thời gian lưu trữ cho sản phẩm.

Số liệu phân tích ở bảng 3.15 cho thấy, với điều kiện nhiệt độ phòng sau 6 tháng bảo quản mật độ VSV có sự biến đổi và giảm theo thời gian nhưng mật độ tế bào ($> 10^9$ CFU/g). Điều này cho thấy cần thiết phải bảo quản chế phẩm trong những điều kiện thích hợp tránh sự hút ẩm, sự biến động của nhiệt. Đây là những nguyên nhân làm VSV tổn thất.

Irena Rogelj (2002) làm thí nghiệm để kiểm tra mật độ *L.acidophilus* trong chế phẩm bổ sung vào thức ăn của heo, sau 10 ngày kiểm tra được 1×10^9 CFU/g trên môi trường MRS.[31]

Renata G. K. Leuschner (2004) mật độ tế bào *S.cerevisiae* trong chế phẩm probiotic phải $> 10^7$ CFU/g, như vậy kết quả nghiên cứu đạt chỉ tiêu.[53]

Theo nghiên cứu của Nguyễn (2008) *B.subtilis* dùng trong chế phẩm vi sinh đạt $3,3 \times 10^9$ CFU/g [5], vậy kết quả nghiên cứu phù hợp.

Khi bổ sung chế phẩm probiotics cho cá với mật độ 10^9 CFU/g, sau 2 tháng kiểm tra cá tăng trưởng nhanh và số lượng VSV gây bệnh đường ruột đã giảm đáng kể bởi Hélène (2010).[28]

3.4. Nghiên cứu hiệu quả của việc sử dụng chế phẩm probiotics trong chăn nuôi gà

Đối với VSV nuôi cấy ổn định trong phòng thí nghiệm không phải chịu nhiều tác động bất lợi của môi trường, nên nếu chuyển sang một môi trường mới thì sẽ gặp rất nhiều khó khăn. Môi trường mới này luôn chứa đựng những yếu tố bất lợi cho sự thích nghi, cũng như sự sinh trưởng phát triển của chúng. Chỉ có những cá thể thích nghi được mới tồn tại và phát triển, ngược lại chúng sẽ bị đào thải. Khi đã tồn tại và ổn định, chúng sẽ bắt đầu sinh trưởng phát triển làm cho số lượng VSV tăng lên đáng kể, đây là nguồn VSV cần thiết

cung cấp cho đường tiêu hoá của vật nuôi và mang lại hiệu quả trong chăn nuôi.

Mặt khác, trong đường tiêu hoá của vật nuôi có một hệ VSV rất đa dạng và mỗi VSV đều chịu nhiều tác động qua lại của các VSV khác cũng như điều kiện môi trường nên hiệu quả của chế phẩm vi sinh trong các điều kiện khác nhau là không giống nhau.

Probiotics là bổ sung vào khẩu phần thức ăn một lượng vi sinh vật sống nhằm cải thiện hệ VSV đường ruột. Nó được sử dụng để thay thế kháng sinh trong sản xuất gà như tăng cường miễn dịch, kích thích tăng trưởng, tỉ lệ chuyển đổi thức ăn, cạnh tranh với các thụ thể bám dính, phòng chống các VSV gây bệnh hoặc nhờ vào sự cải thiện chất lượng của môi trường sống bởi Irsha (2006).[33]

Thí nghiệm được bố trí gồm 3 công thức với mỗi công thức là 500 con gà đẻ trứng và 3 lần lặp lại. Sau khi trộn chế phẩm với thức ăn, tiến hành cho gà đẻ trứng ăn và theo dõi sau 6 tháng bằng cách đếm số lượng, cân khối lượng trứng từng tháng và đếm số con gà bị bệnh. Kết quả được trình bày ở các bảng sau:

Theo dõi trong thời gian 6 tháng với 3 công thức là:

Đối chứng: không bổ sung chế phẩm probiotics

CT1: bổ sung 0,5g chế phẩm probiotics trong 50kg thức ăn với mật độ $5,3 \times 10^{10}$ CFU/g.

CT2: bổ sung 1,0g chế phẩm probiotics trong 50kg thức ăn với mật độ $5,3 \times 10^{10}$ CFU/g.

3.4.1. Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng

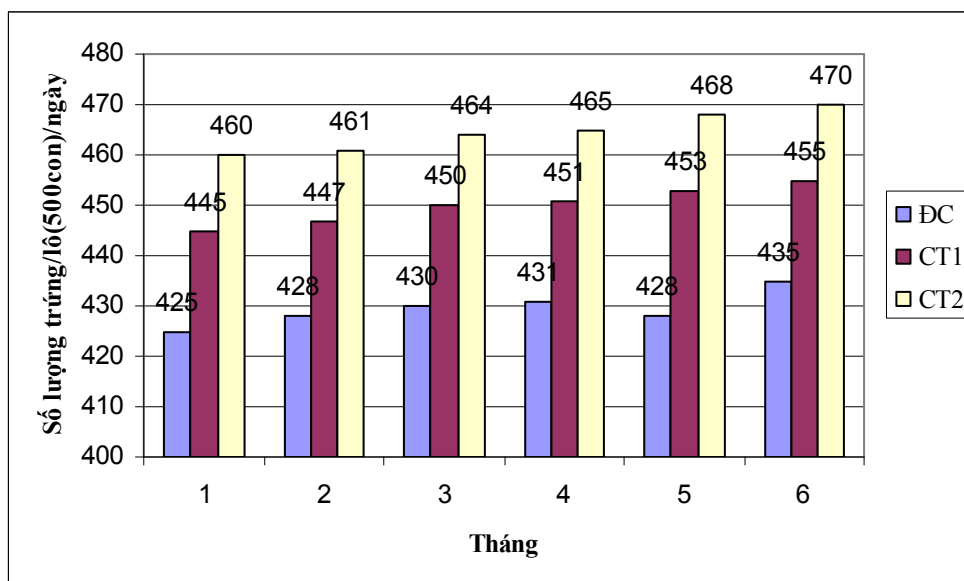
Theo dõi ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng bởi 2 công thức đã nêu trên so với đối chứng trong thời gian 6 tháng, mục đích đánh giá hiệu quả của việc sử dụng chế phẩm ở gà đẻ trứng. Kết quả ghi nhận trong bảng 3.16.

Bảng 3.16: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng

Số lượng trứng/lô (500con)/ngày	1	2	3	4	5	6
Đối chứng	425	428	430	431	428	435
CT1	445	447	450	451	453	455
CT2	460 ^{abc}	461 ^{abc}	464 ^{abc}	465 ^{abc}	468 ^{ab}	470 ^a
CV%	0,43					

(Các trị số trên cùng một hàng có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Số liệu bảng 3.16 thể hiện qua biểu đồ 3.8.



Biểu đồ 3.8: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng

Qua kết quả ở biểu đồ 3.8 cho thấy số lượng trứng ở CT1 và CT2 đều cao hơn so với đối chứng. Sau 1 tháng bổ sung chế phẩm probiotics vào thức ăn của gà đẻ trứng thì số lượng trứng TB ở CT1 là 445, CT2 là 460 đã cao hơn so với đối chứng chỉ đạt 425 quả. Tháng 2 số lượng trứng TB thu được ở CT1 là 447, CT2 là 461, đối chứng 428. Tương tự sau 3 tháng số lượng trứng TB thấp nhất là đối chứng 430, CT1 thu được 450, CT2 là 464. Theo dõi đến tháng thứ 4 thì số lượng trứng TB ở CT1 là 451, CT2 là 465 đối chứng chỉ được 431

quả. Số lượng trứng TB được duy trì ổn định ở 2 tháng tiếp theo. Tỷ lệ đạt tăng lần lượt ở các tháng và đạt nhất là ở tháng thứ sáu CT1 đạt 91%, CT2 đạt 94% so với đối chứng chỉ đạt 87% có lẽ do chúng ta đã bổ sung một lượng VSV có lợi vào đường tiêu hóa của gà và chúng đã tồn tại, nhân lên và có tác dụng. Các tháng tiếp theo số lượng trứng ở từng ô cũng tăng và số lượng trứng ở từng tháng chênh lệch không đáng kể vì lượng VSV trong đường ruột của gà đã dần ổn định. Điều này chứng tỏ chế phẩm probiotics này có hiệu quả đối với gà đẻ trứng.

3.4.2. Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khối lượng trứng

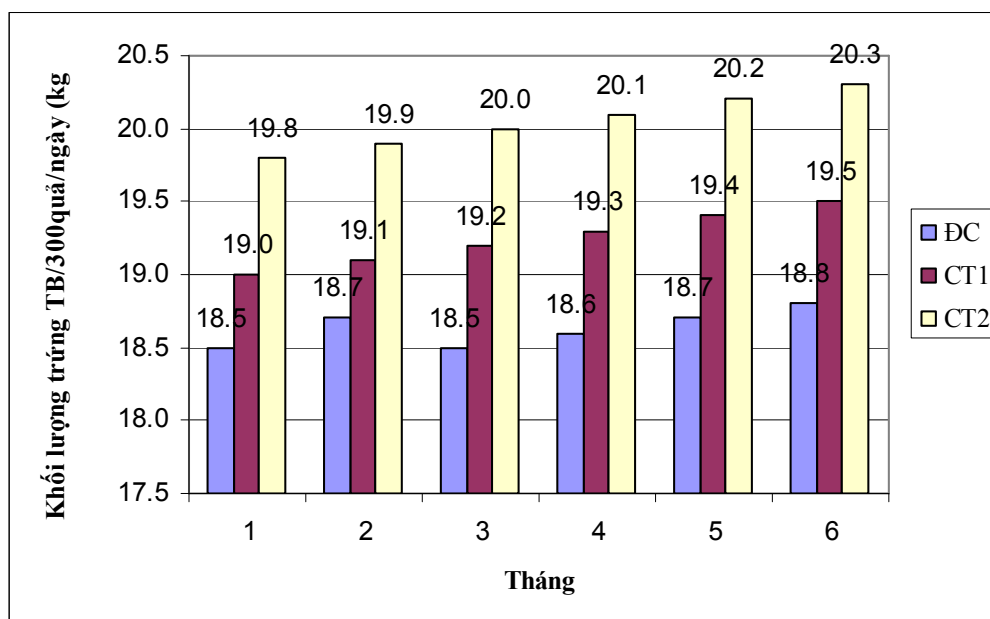
Trong quá trình theo dõi ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng, chúng tôi tiến hành cân khối lượng trứng theo từng ngày và giá trị trung bình trên tháng. Kết quả thu được ở bảng 3.17.

Bảng 3.17: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khối lượng trứng

Khối lượng trứng TB/300 quả/ngày (kg)	1	2	3	4	5	6
Đối chứng	18,5	18,7	18,5	18,6	18,7	18,8
CT1	19,0	19,1	19,2	19,3	19,4	19,5
CT2	19,8	19,9	20,0	20,1 ^{abc}	20,2 ^{ab}	20,3 ^a
CV%	0,34					

(Các trị số trên cùng một hàng có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Từ bảng số liệu 3.17 xây dựng được biểu đồ 3.9.



Biểu đồ 3.9: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khối lượng trứng

Khối lượng trứng ở biểu đồ 3.9 cho thấy CT1 và CT2 đều tăng so với đối chứng. Sau 1 tháng bổ sung chế phẩm probiotics vào thức ăn thì khối lượng trứng TB/300 quả ở lô đối chứng là 18,5kg CT1 đạt 19,0kg và CT2 là 19,8kg. Qua tháng 2 khối lượng trứng TB thấp nhất cũng là lô đối chứng 18,7kg so với CT1 19,1kg và CT2 19,9kg. Tiếp tục theo dõi ở các tháng tiếp theo thì khối lượng trứng TB ở CT1 và CT2 cao hơn đối chứng. Và khi bổ sung chế phẩm probiotics vào thức ăn thì khối lượng trứng TB tăng lên theo thời gian và đến tháng thứ 6 ở CT1 đạt 19,5kg tức đã tăng 3,59%, CT2 đạt 20,3kg tăng 7,39% so với đối chứng. Ở CT2 khối lượng trứng đã tăng đáng kể so với CT1 và đối chứng. Khối lượng cao nhất là vào tháng thứ 5 (20,2kg) và thứ 6 (20,3kg) ở CT2 bổ sung probiotics. Điều này chứng tỏ chế phẩm probiotics đã ảnh hưởng tích cực đến khối lượng trứng gà.

Ioan Paşca (2009) đã bổ sung probiotics vào thức ăn cho heo cai sữa, kết quả trung bình tăng 210 g/ngày so với đối chứng là 180 g/ngày [30].

B. M. Bøghmer (2006) sau 90-110 ngày bổ sung probiotics vào khẩu phần thức ăn của heo chuẩn bị làm mẹ thì trọng lượng tăng 16kg so với đối chứng chỉ tăng 12 kg.[19]

Mathieu Castex (2008) bổ sung probiotics vào thức ăn của tôm, sau 5 tuần theo dõi tỉ lệ sống tăng 15%, trọng lượng đã tăng 9-10%, lượng enzyme α -amylase và trypsin trong ống tiêu hoá tăng 55%.[43]

3.4.3. Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khả năng kháng bệnh ở gà đẻ trứng

Khi cho gà dùng kháng sinh có thể xuất hiện triệu chứng “rối loạn tiêu hoá” như sinh bụng, khó tiêu, tiêu chảy do thức ăn không được tiêu hoá hết nhờ hệ VSV đường ruột. Các thức ăn này lên men tạo acid hoá đường ruột hoặc sinh ra các chất trung gian nhiều hơn bình thường như khí NH_3 , H_2S ,...

Nếu đường ruột không tự tái lập lại hệ vi sinh-tiêu hoá bình thường trở lại sau khi ngưng kháng sinh thì tiêu chảy sẽ kéo dài. Kết quả tiêu chảy kéo dài làm mất chất nhày bảo vệ niêm mạc ruột, các chất trung gian hình thành do thức ăn thối rữa sẽ gây tổn thương lớp biểu bì ruột đã bị mất màng nhày, mất nước. Lớp niêm mạc ngoài cùng trong ống ruột sẽ bị trầy, bất kỳ thức ăn nào cũng gây kích ứng bề mặt ống ruột, tăng nhu động ruột, co thắt hoặc phình do sinh hơi nên gà bị bệnh sẽ tiêu chảy. Ảnh hưởng đến môi trường sống và kinh tế người chăn nuôi.

Thực tế là không dùng kháng sinh mà bổ sung các vi sinh có lợi vào đường tiêu hoá của gà đẻ trứng để đảm bảo lượng vi sinh đường ruột và phòng ngừa các trường hợp có thể gây nhiễm bệnh.

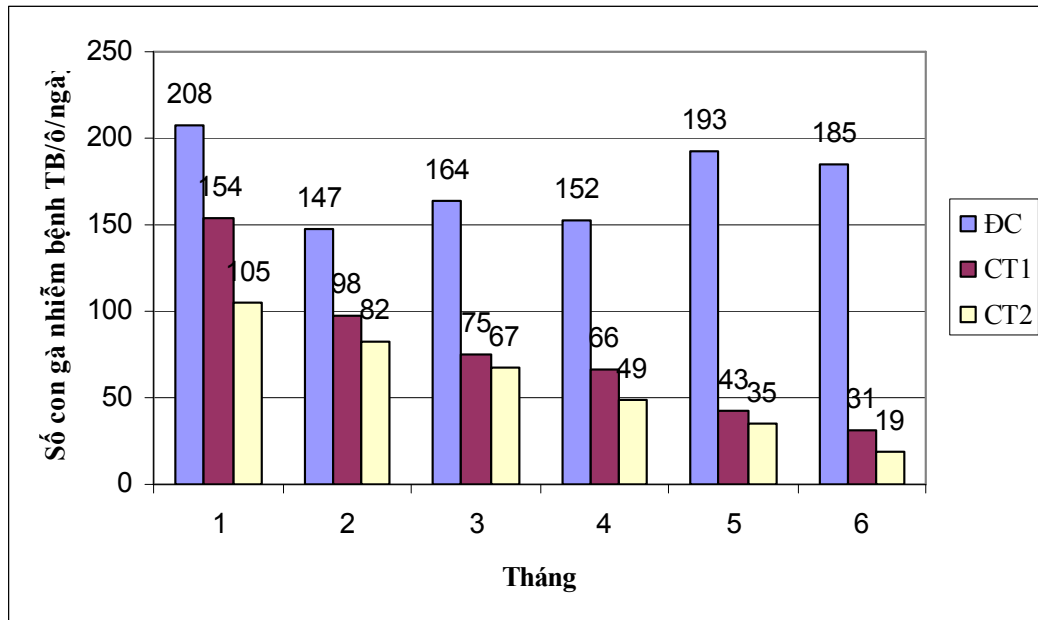
Thí nghiệm này cũng được tiến hành với 3 công thức trên và theo dõi trong thời gian 6 tháng. Kết quả thu được ở bảng 3.18.

Bảng 3.18: Số con gà bị nhiễm bệnh TB trong ô theo ngày

Số con gà nhiễm bệnh TB/ô/ngày	1	2	3	4	5	6
Đối chứng	208 ^a	147 ^{abcde}	164 ^{abcd}	152 ^{abcde}	193 ^{ab}	185 ^{abc}
CT1	154 ^{abcde}	98 ^{cdef}	75 ^{def}	66 ^{ef}	43 ^f	31 ^f
CT2	105 ^{bcdef}	82 ^{def}	67 ^{ef}	49 ^f	34 ^f	19 ^f
CV%	3,81					

(Các trị số có các chữ cái giống nhau ở cùng một hàng không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD với mức ý nghĩa 0,01)

Số liệu bảng 3.18 được thể hiện qua biểu đồ 3.10.



Biểu đồ 3.10: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khả năng kháng bệnh của gà đẻ trứng

Biểu đồ 3.10 cho thấy số con gà bị nhiễm bệnh ở CT1 và CT2 đã giảm so với đối chứng. Qua xử lý thống kê đối với CT1 đến tháng thứ 6 thì khả năng miễn dịch của gà đẻ trứng mới đạt hiệu quả trong khi đó CT2 đạt kết quả từ tháng thứ 5. Điều này chứng tỏ khi bổ sung lượng vi sinh càng nhiều thì hiệu quả càng nhanh và các vi sinh của chúng ta đã hoạt động tốt trong đường tiêu hoá của gà đẻ trứng.

Hiệu quả kháng khuẩn của *L. acidophilus* chủ yếu là sản phẩm tiết bacteriocins và đã được thử nghiệm thành công trên chuột và heo bởi Bogovic-Matijasic' and Rogelj [18],[54]. Marcene (2008) cũng đã khẳng định sản phẩm bacteriocins ngăn chặn ngộ độc bởi một số vi khuẩn như *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, và *Listeria* [41].

Probiotic *L.acidophilus* có tác dụng chống bệnh nhiễm trùng và ngăn chặn ngộ độc thức ăn bởi một số sản phẩm sau 24h nuôi cấy đã tăng đáng kể n-butyrate (tăng 60%) và n-valerate (tăng 50%) Marteau (2001).[42]

Probiotic *S.cerevisiae* được bổ sung vào thức ăn và chúng đã có hiệu quả trên nhiều đối tượng động vật khác nhau [21]. Khi bổ sung 1% lượng *S.cerevisiae* vào thức ăn của chim cút thì trọng lượng của chúng đạt 206g/6tuần tuổi cao hơn so với đối chứng là 202g [37].

Với probiotic *S.cerevisiae* được bổ sung vào thức ăn của cừu giúp cừu tăng khả năng miễn dịch đó là chúng đã kháng được *Brucella abortus* (vi khuẩn gây sẩy thai) có hiệu quả sau 28 ngày sử dụng và phản ứng miễn dịch trên gà cũng được Nayebpor et al(2007) and Al Homidan and Fahmy (2007) báo cáo.[27]

B. M. Bo' hmer (2006) khi bổ sung probiotics vào thức ăn heo mẹ thì trong chất thải của heo con có *Enterococcus* gây bệnh nhiễm trùng đã giảm còn 7,7 so với đối chứng là 9,2; kết quả giảm được bệnh và tạo sản phẩm thịt sạch trong chăn nuôi.[19]

Ngoài ra nguồn nước uống và khí hậu theo mùa cũng ảnh hưởng đến khả năng miễn dịch của vật nuôi. Chất lượng nước và việc kiểm soát bệnh là vấn đề rất quan trọng trong chăn nuôi, nó có quan hệ trực tiếp và ảnh hưởng nhiều bởi hoạt động của vi sinh vật.

Việc sử dụng chế phẩm sinh học nhằm hạn chế tối đa khả năng sử dụng kháng sinh trong việc phòng và trị bệnh vật nuôi là xu hướng đúng nhằm tránh khả năng tạo ra các dòng vi khuẩn kháng thuốc ảnh hưởng đến sức khỏe

vật nuôi và con người. Tuy nhiên, hiệu quả của việc sử dụng chế phẩm sinh học còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó tính năng của các dòng vi khuẩn trong chế phẩm là yếu tố quan trọng nhất. Hiện nay, hiệu quả sử dụng của probiotics chỉ được khẳng định đối với các trường hợp sử dụng trong điều kiện môi trường được kiểm soát tốt (phòng thí nghiệm, trại sản xuất giống hoặc trại nuôi trong nhà). Trường hợp ở các trang trại ngoài trời, điều kiện môi trường biến động lớn thì hiệu quả sử dụng của probiotics chưa được chứng minh một cách rõ ràng.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

- Đã nghiên cứu được điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh lựa chọn để sản xuất chế phẩm trong phòng thí nghiệm.

B. subtilis sinh trưởng tốt trong môi trường MT1-B với pH 5,5-6,0, nhiệt độ nuôi cấy từ 30-35⁰C, tốc độ lắc là 200 vòng/phút và sinh khối đạt sau 48h.

L.acidophilus môi trường tối ưu là MT1-L, pH 5,0-5,5, nhiệt độ thích hợp 30-35⁰C, lắc với tốc độ 150 vòng/phút và sau 48h thu sinh khối.

Môi trường nuôi cấy tốt nhất của *S.cerevisiae* là MT1-S, pH 5,5-6,0 và nhiệt độ từ 30-35⁰C, lắc 150 vòng/phút và mật độ tế bào cao nhất sau 48h.

Nitrosomonas sp. môi trường thích hợp là MT1-N với pH từ 5,5-6,0 và nhiệt độ 30-35⁰C, tốc độ lắc là 150 vòng/phút, thời gian nuôi cấy là 36h.

- Xây dựng được quy trình lên men và tạo chế phẩm bao gồm 4 chủng vi sinh probiotics. Mật độ tế bào của chế phẩm ở tháng thứ nhất là $5,3 \times 10^{10}$ CFU/g, sau 6 tháng bảo quản mật độ tế bào giảm dần và đến tháng thứ 6 còn $1,56 \times 10^{10}$ CFU/g. Chế phẩm có mật độ khá ổn định, sau 6 tháng mật độ của *B. subtilis* là $4,6 \times 10^9$ CFU/g, *L.acidophilus* $4,1 \times 10^9$ CFU/g, *S.cerevisiae* $4,2 \times 10^9$ CFU/g, *Nitrosomonas* sp. $2,7 \times 10^9$ CFU/g. Đạt tiêu chuẩn chế phẩm probiotics cho chăn nuôi.

- Chế phẩm vi sinh probiotics có ảnh hưởng tích cực đến năng suất trứng.

Sau 6 tháng thử nghiệm chế phẩm số lượng trứng TB/ô ở CT2 là 470 quả (tăng 7,4%), CT1 là 455 quả tăng 4,3% so với đối chứng.

Khối lượng trứng TB/300 quả ở CT1 đạt 19,5kg (tăng 3,6%) và CT2 20,3kg tăng 7,4% so với đối chứng.

Đề nghị

- Theo dõi mật độ VSV trong chế phẩm vi sinh probiotics.
- Thử nghiệm chế phẩm vi sinh probiotics trên các đối tượng khác với mục đích tạo ra chế phẩm vi sinh được sử dụng rộng rãi trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Lâm Dũng, *Vi sinh vật học*, NXB Nông nghiệp, 2000.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Văn Ty, Dương Đức Tiên (1979), *Vi sinh vật học tập 1*, Nxb Đại học và Trung học chuyên nghiệp.
3. Vũ Duy Giảng (2008). Tạp chí KHKT thức ăn chăn nuôi số 6 "*Acid hữu cơ bổ sung vào thức ăn và những chú ý khi sử dụng*".
4. Đỗ Thị Hạnh (2006). Luận văn Thạc sĩ khoa học. Đại học Bách Khoa Hà Nội "*Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn lactic phân lập từ nem chua để ứng dụng vào công nghệ sản xuất nem chua nhằm nâng cao chất lượng và kéo dài thời gian bảo quản*".
5. Nguyễn Văn Nguyễn, Phạm Duy Hải, Giáp Văn Thắng (2008), Nghiên cứu sử dụng chất mang tạo viên chế phẩm vi sinh dùng trong xử lý ao nuôi thủy sản, *Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II*
6. Nguyễn Như Pho, Nguyễn Thị Trà An (2003), Tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi heo và tồn dư kháng sinh trong thịt và thận heo, *Kỹ yếu Hội thảo sản xuất và chế biến thực phẩm sạch, Tp.HCM 11/2003, tr. 147-151*.
7. Nguyễn Xuân Thành, Lê Văn Hưng, Phạm Văn Toàn (2003), *Công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường*, Nxb nông nghiệp.
8. Đinh Thiện Thuận, Võ Bá Lâm (2003), Khảo sát sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi và dư lượng kháng sinh trong quây thịt heo gà thương phẩm tại Bình Dương, *Kỹ yếu Hội thảo sản xuất và chế biến thực phẩm sạch, Tp.HCM 11/2003, tr 190-196*.
9. Trần Linh Thuốc, 2002, *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, NXB Giáo dục.
10. Trần Thanh Thủy, *Hướng dẫn thực hành Vi sinh vật học*, NXBGD, 1998.

11. Bùi Trung Trực, Nguyễn Việt Nga (2003). Phòng ngừa tiêu chảy heo con bằng chế phẩm sinh học, Kỹ yếu Hội thảo sản xuất và chế biến thực phẩm sạch, *Tp.HCM 11/2003*, tr. 217-227.
12. Đặng Thị Hoàng Oanh, 2005, *Nguyên lý và kỹ thuật chẩn đoán bệnh thủy sản*, Nxb nông nghiệp.
13. Vũ Ngọc Út, 2008, *Phát triển các kỹ thuật phân tích sinh học và hoá học nhằm hỗ trợ nghề nuôi thủy sản bền vững ở Việt Nam*, Đại học Cần Thơ và Viện Thủy Sản.
14. <http://www.sinhhocvietnam.com/forum/archive/index.php?t-688.html>.
15. www.farvi.org.vn

Tài liệu nước ngoài

16. Ali A (2000). Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Ume^oa, Sweden.
17. José L. Balcázara, Daniel Vendrella, Ignacio de Blasa, Imanol Ruiz-Zarzuelaa, José L. Muzquiza, Olivia Gironesa (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish, *Aquaculture*, Pages 188-191
18. Bogovic[˘]-Matijas[˘]ic[˘], Rogelj, 1998. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221—production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochem.* 3, 345– 352.
19. B. M. Bo[¨] hmer¹, W. Kramer² and D. A. Roth-Maier (2006) Dietary probiotic supplementation and resulting effects on performance, health status, and microbial characteristics of primiparous sows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90 309–315
20. Doyle ME (2001) Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry. FRI Briefings, Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, WI.

21. Durand-Chaucheyras, Fonty, Bertin, Theveniot, Gouet: Fate of Levucell® SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 275–280 (1998).
22. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66: 365–378.
23. Fuller R (1992) Probiotics: History and Development of Probiotics. Chapman & Hall, New York.
24. Fumiaki Abe, Norio Ishibashi (1995), Effect of administration of Bifidobacteria and Lactic acid Bacteria to newborn calves and piglets, *J. Dairy Science*, 78, 2838-2846
25. Gatesoupe (1991) The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*, *Aquaculture*, Pages 335-342
26. Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E & Ringo E (1997) Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352: 279–285.
27. Ch Harikrishna, Ch Harikrishna, M Mahender, Y Ramana Reddy, M G Prakash, D B V Ramana*, A Sarat Chandra, Ch Venkatesaiah and M Venkateswarlu (2010) Influence of feeding complete diet supplemented with thermotolerant probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on humoral immune response in Nellore ram lambs. *Received 10 August 2010; Accepted 15 August 2010; Published 1 October 2010*
28. Hélène L. Lauzon, Sigridur Gudmundsdottir, Agnar Steinarrsson, Matthias Oddgeirsson, Emilia Martinsdottir and Bjarnheidur K. Gudmundsdottir (2010) Impact of probiotic intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. *Aquaculture*, Volume 310, Issues 1-2, Pages 139-144

29. Pablo Intriago, D.A. Jones (1993) Bacteria as food for Artemia, *Aquaculture*, Pages 115-127
30. Ioan Paşca (2009) The importance of probiotics administration to sucking pigs. *Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.7 (3&4) : 485 - 491*
31. Irena Rogelj (2002) The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 76 (2002) 83– 91
32. Irianto A & Austin B (2003) Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *J Fish Dis* 26: 59–62.
33. Irshad Ahmad (2006) Effect of Probiotics on Broilers Performance. *International Journal of Poultry Science* 5 (6): 593-597.
34. Jagoda (2010), Croatia "Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria"
35. Pikul Jiravanichpaisala, Narongsak Puanglarpa, Sasithon Petkona, Seri Donnueaa, Irene Söderhällb, Kenneth Söderhäll (2007) Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, *Fish & Shellfish Immunology*, Pages 815-824
36. Havenaar (1994) Probiotics from an immunological point of view, *Current Opinion in Biotechnology*, Pages 320-325
37. KWSAR A. GHALLY & S. A. ABD EL-LATIF (2007) Effect of dietary yeast on some productive and physiological aspects of growing Japanese quails. *African Crop Science Conference Proceedings Vol. 8. 2147-2151*
38. Kumprechtova, Zbac, Kumprecht (2000) The effect of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 on chicken broiler performance and nitrogen output. *Czech J. Animal Sci.* 45, 169–177 .
39. Madigan (2001) Molecular evidence that the capacity for endospore formation is universal among phototrophic heliobacteria, *Veterinary Parasitology*, Pages 191-195

40. Xavier Malcata, Cláudia I. Pereira, Eliza O. Gomes, Ana M.P. Gomes(2007) Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture, *Food Chemistry, Volume 108*, Pages 862-868
41. Marcene R. McVay, Cristiano Boneti, Christine M. Habib, Jennifer E. Keller, Evan R. Kokoska, Richard J. Jackson, Samuel D. Smith (2008) Formula fortified with live probiotic culture reduces pulmonary and gastrointestinal bacterial colonization and translocation in a newborn animal model. *Journal of Pediatric Surgery 43*, 25–29
42. Marteau RP, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition 73*, 430S– 436S.
43. Mathieu Castex, Liet Chim, Dominique Pham, Pierrette Lemaire, Nelly Wabete, Jean-Louis Nicolas, Philippe Schmidely and Catherine Mariojouis (2008) Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture, Volume 275*, Pages 182-193
44. Oraporn Meunpol , Kanyajit Lopinyosirib, Piamsak Menasveta (2002) The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Aquaculture*, Pages 437-448
45. Moriarty (1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds, *Aquaculture*, Pages 333-349
46. M.S.R. Nair, Paul Cheung, Ina Leong, George D. Ruggieri (1985) A non-proteinaceous toxin from the venomous spines of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus), *Toxicon*, Pages 525-527
47. Najib (1996) Effect of incorporating yeast culture *Saccharomyces cerevisiae* into the Saudi Baladi and white leghorn layer's diet. *J. Appl. Animal Res. 10*, 181–186.

48. Norio Ishibashi (2001), Probiotic and safety, *Am J Clin Nutr*, 73, 465S-470S.
49. Per-Erik Olsson, Hans Wolf-Watz (2004) Visualisation of Zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*, *International Journal of Medical Microbiology*, Pages 41-46
50. M.J Otte, K Morteoc, L Chen (2002) A global livestock production and health atlas (GLiPHA) for interactive presentation, integration and analysis of livestock data, *Preventive Veterinary Medicine*, Pages 19-32
51. Parker (1974) The influence of time of addition of antifungal agents upon their inhibition of developing fungal spores, *Transactions of the British Mycological Society*, Volume 65, Pages 279-283
52. Renata G.K. Leuschner, Jan Bew, Paul Simpson, Paul R. Ross, Catherine Stanton. (2002) A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. *International Journal of Food Microbiology* 83 (2003) 161– 170.
53. Renata G. K. Leuschner¹, Jan Bew¹, P. Fourcassier², and Gérard Bertin³ (2004) Validation of the Official Control Method Based on Polymerase Chain Reaction (PCR) for Identification of Authorised Probiotic Yeast in Animal Feed . *System. Appl. Microbiol.* 27, 492–500
54. Rogelj, Narat, Hoc̃evan, 1999. The immune response in mice immunized with *Lactobacillus acidophilus* LF221—a potential probiotic strain. *Food Technol. Biotechnol.* 37, 153– 158.
55. Roxana Rico-Mora, Domenico Voltolina, Julio A Villaescusa-Celaya (1998) Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures, *Aquacultural Engineering*, Pages 1-6
56. Salah Mesalhy Alya, , Yousef Abdel-Galil Ahmedb, Ahlam Abdel-Aziz Ghareebb, Moahmed Fathi Mohamed (2008) Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response

and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections, *Fish & Shellfish Immunology*, Pages 128-136

57. J. Skjermoa, O. Vadsteinb (2000) Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemiafranciscana*, *Aquaculture*, Pages 11-25

58. Sugita, Suhyeun Shim, Shoei Sugita, Kunio Sugahara, Hideyuki Tanaka (1997) Feeding Rhythm and Ornithine Decarboxylase Activity in Hereditary Microphthalmic Rats, *Physiology & Behavior* , Pages 1365-1369

59. Vaseeharan B & Ramasamy P (2003) Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol* 36: 83–87.

60. V'azquez JA, Gonz'alez MP & Murado MA (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245: 149–161.

61. Verschuere L, Rombout G, Sorgeloos P & Verstraete W (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 655–671.

62. Westerdahl, B.L. Kelsall (1992) Antigenicity, immunogenicity and vaccine efficacy of the galactose specific adherence proteon of *Entamoeba histolytica*, *Vaccine*, Pages 270

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Các bảng phụ để xây dựng đường tương quan tuyến tính giữa OD và A (CFU/ml)

- *Bacillus subtilis*

Thời gian (h)	Số khuẩn lạc ở các độ pha loãng			Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)	OD _{625nm}
	LLL	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
12	1	26	4	2,8×10 ⁹	0,056
	2	30			
24	1	95	25	9,6×10 ⁹	0,190
	2	82			
36	1	127	31	1,2×10 ¹⁰	0,471
	2	98			
48	1	163	42	1,7×10 ¹⁰	0,559
	2	167			

- *Lactobacillus acidophilus*

Thời gian (h)	Số khuẩn lạc ở các độ pha loãng			Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)	OD _{600nm}
	LLL	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
12	1	30	7	3,1×10 ⁹	0,054
	2	29			
24	1	97	30	1,0×10 ¹⁰	0,194
	2	95			
36	1	132	41	1,4×10 ¹⁰	0,485
	2	129			
48	1	188	52	2,0×10 ¹⁰	0,700
	2	181			

- *Saccharomyces cerevisiae*

Thời gian (h)	Số khuẩn lạc ở các độ pha loãng			Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)	OD _{610nm}
	LLL	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
12	1	34	9	3,8×10 ⁹	0,089
	2	37			
24	1	79	16	8,5×10 ⁹	0,196
	2	83			
36	1	110	20	1,1×10 ¹⁰	0,521
	2	97			
48	1	152	39	1,7×10 ¹⁰	0,536
	2	167			

- *Nitrosomonas* sp.

Thời gian (h)	Số khuẩn lạc ở các độ pha loãng			Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)	OD _{625nm}
	LLL	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
12	1	28	8	3,2×10 ⁹	0,080
	2	31			
24	1	84	33	9,8×10 ⁹	0,252
	2	89			
36	1	137	41	1,5×10 ¹⁰	0,533
	2	140			

Phụ lục 2. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sinh trưởng của các chủng

Title: *B.subtilis*

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 9.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: moitruong) with values from 1 to 3

Variable 3: OD625nm

Grand Mean = 0.426 Grand Sum = 3.837 Total Count = 9

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.433	1.298
2	*	0.419	1.258
3	*	0.427	1.281
*	1	0.558	1.673
*	2	0.272	0.815
*	3	0.450	1.349

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
1	Replication	2	0.000	0.000	0.0742	
2	Factor A	2	0.125	0.063	34.5447	0.0030
-3	Error	4	0.007	0.002		
Total		8	0.133			

Coefficient of Variation: 9.98%

Phân hạng ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sinh trưởng của B.subtilis

Error Mean Square = 0.0006300

Error Degrees of Freedom = 2

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.2034 at alpha = 0.010

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.5600 A	Mean	1 =	0.5600 A
Mean	2 =	0.2700 B	Mean	3 =	0.4500 AB
Mean	3 =	0.4500 AB	Mean	2 =	0.2700 B

Title: *L.acidophilus*

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 9.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: moitruong) with values from 1 to 3

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.426 Grand Sum = 3.837 Total Count = 9

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.413	1.240
2	*	0.442	1.327
3	*	0.423	1.270
*	1	0.700	2.099
*	2	0.238	0.713
*	3	0.342	1.025

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
1	Replication	2	0.001	0.001	0.9789	
2	Factor A	2	0.352	0.176	264.9807	0.0001
-3	Error	4	0.003	0.001		
Total		8	0.356			

Coefficient of Variation: 6.05%

Phân hạng ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sinh trưởng của L.acidophilus

Error Mean Square = 0.001760

Error Degrees of Freedom = 2

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.3400 at alpha = 0.010

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.7000 A	Mean	1 =	0.7000 A
Mean	2 =	0.2400 B	Mean	3 =	0.3400 B
Mean	3 =	0.3400 B	Mean	2 =	0.2400 B

Title: *S.cerevisiae*

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 9.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: cacmoitruong) with values from 1 to 3

Variable 3: OD610nm

Grand Mean = 0.470 Grand Sum = 4.231 Total Count = 9

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.468	1.404
2	*	0.477	1.431
3	*	0.465	1.396
*	1	0.536	1.609
*	2	0.399	1.197
*	3	0.475	1.425

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
1	Replication	2	0.000	0.000	0.3122	
2	Factor A	2	0.028	0.014	39.5396	0.0023
-3	Error	4	0.001	0.000		
Total		8	0.030			

Coefficient of Variation: 4.03%

Phân hạng ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sinh trưởng của S.cerevisiae

Error Mean Square = 0.0001400

Error Degrees of Freedom = 2

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.09588 at alpha = 0.010

	Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.5400	A	Mean	1 =	0.5400 A
Mean	2 =	0.4000	B	Mean	3 =	0.4800 AB
Mean	3 =	0.4800	AB	Mean	2 =	0.4000 B

Title: *Nitrosomonas* sp.

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 12.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplap) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: mt) with values from 1 to 4

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.330 Grand Sum = 3.959 Total Count = 12

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.334	1.336
2	*	0.324	1.295
3	*	0.332	1.328
* 1		0.533	1.599
* 2		0.403	1.209
* 3		0.259	0.776
* 4		0.125	0.375

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
	Replication	2	0.000	0.000	0.2173	1
2	Factor A	3	0.281	0.094	172.3381	0.0000
-3	Error	6	0.003	0.001		
Total		11	0.284			

Coefficient of Variation: 7.07%

Phân hạng ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sinh trưởng của Nitrosomonas sp.

Error Mean Square = 0.0009400

Error Degrees of Freedom = 3

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1462 at alpha = 0.010

	Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.5300	A	Mean	1 =	0.5300 A
Mean	2 =	0.4000	AB	Mean	2 =	0.4000 AB
Mean	3 =	0.2600	BC	Mean	3 =	0.2600 BC
Mean	4 =	0.1300	C	Mean	4 =	0.1300 C

Phụ lục 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng
 Title: *B. subtilis*

Thời gian nuôi cấy (h) <i>Bacillus subtilis</i> (OD _{625nm})	3 lần lặp lại	12	24	36	48	60	72	96
	L1	0,061	0,193	0,448	0,569	0,515	0,387	0,292
	L2	0,052	0,187	0,489	0,593	0,506	0,359	0,291
	L3	0,054	0,191	0,476	0,511	0,488	0,330	0,263
	TB	0,056	0,190	0,471	0,559	0,503	0,359	0,282

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 21.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: thoigiannuocay) with values from 1 to 7

Variable 3: OD_{625nm}

Grand Mean = 0.345 Grand Sum = 7.255 Total Count = 21

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.352	2.465
2	*	0.354	2.477
3	*	0.330	2.313
*	1	0.056	0.167
*	2	0.190	0.571
*	3	0.471	1.413
*	4	0.558	1.673
*	5	0.503	1.509
*	6	0.359	1.076
*	7	0.282	0.846

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication		2	0.002	0.001	3.0792	0.0833
2	Factor A	6	0.594	0.099	255.1424	0.0000
-3	Error	12	0.005	0.000		
Total		20	0.601			

Coefficient of Variation: 5.70%

Phân hạng ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của *B.subtilis*

Error Mean Square = 0.009900

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.3012 at alpha = 0.010

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 = 0.06000	C	Mean	4 = 0.5600	A
Mean	2 = 0.1900	BC	Mean	5 = 0.5000	A
Mean	3 = 0.4700	AB	Mean	3 = 0.4700	AB
Mean	4 = 0.5600	A	Mean	6 = 0.3600	ABC
Mean	5 = 0.5000	A	Mean	7 = 0.2800	ABC
Mean	6 = 0.3600	ABC	Mean	2 = 0.1900	BC
Mean	7 = 0.2800	ABC	Mean	1 = 0.06000	C

Title: *L.acidophilus*

Thời gian (h) nuôi cấy <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> (OD _{600nm})	3 lần lặp lại	12	24	36	48	60	72	96
	L1	0,057	0,199	0,484	0,691	0,391	0,212	0,124
	L2	0,056	0,180	0,489	0,684	0,384	0,241	0,120
	L3	0,050	0,204	0,483	0,724	0,424	0,239	0,109
	TB	0,054	0,194	0,485	0,700	0,400	0,231	0,118

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 21.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: thoigian) with values from 1 to 7

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.312 Grand Sum = 6.545 Total Count = 21

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.308	2.158
2	*	0.308	2.154
3	*	0.319	2.233
*	1	0.054	0.163
*	2	0.194	0.583
*	3	0.485	1.456
*	4	0.700	2.099
*	5	0.400	1.199
*	6	0.231	0.692
*	7	0.118	0.353

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication	2	0.001	0.000	1.4923	0.2638	
2	Factor A	6	0.938	0.156	824.5781	0.0000
-3	Error	12	0.002	0.000		
Total	20	0.941				

Coefficient of Variation: 4.42%

Phân hạng ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của L. acidophilus

Error Mean Square = 0.01560

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.3781 at alpha = 0.010

	Original Order			Ranked Order		
Mean 1	=	0.05000	C	Mean 4	=	0.7000 A
Mean 2	=	0.1900	BC	Mean 3	=	0.4900 AB
Mean 3	=	0.4900	AB	Mean 5	=	0.4000 ABC
Mean 4	=	0.7000	A	Mean 6	=	0.2300 BC
Mean 5	=	0.4000	ABC	Mean 2	=	0.1900 BC
Mean 6	=	0.2300	BC	Mean 7	=	0.1200 BC
Mean 7	=	0.1200	BC	Mean 1	=	0.05000 C

Title: *S.cerevisiae*

	3 lần lặp lại	12	24	36	48	60	72	96
Thời gian nuôi cấy (h)	L1	0,105	0,184	0,505	0,549	0,420	0,308	0,188
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L2	0,074	0,190	0,518	0,550	0,396	0,305	0,206
(OD _{610nm})	L3	0,089	0,214	0,539	0,510	0,416	0,309	0,182
	TB	0,089	0,196	0,521	0,536	0,411	0,307	0,192

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 21.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: thoigiannuocay) with values from 1 to 7

Variable 3: OD610nm

Grand Mean = 0.322 Grand Sum = 6.757 Total Count = 21

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.323	2.259
2	*	0.320	2.239
3	*	0.323	2.259

*	1	0.089	0.268
*	2	0.196	0.588
*	3	0.521	1.562
*	4	0.536	1.609
*	5	0.411	1.232
*	6	0.307	0.922
*	7	0.192	0.576

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication		2	0.000	0.000	0.0708	
2	Factor A	6	0.541	0.090	335.3830	0.0000
-3	Error	12	0.003	0.000		

Total		20	0.544			

1

Coefficient of Variation: 5.10%

Phân hạng ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của S.cerevisiae

Error Mean Square = 0.009000

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.2872 at alpha = 0.010

	Original Order	Ranked Order
Mean	1 = 0.09000 C	Mean 4 = 0.5400 A
Mean	2 = 0.2000 BC	Mean 3 = 0.5200 A
Mean	3 = 0.5200 A	Mean 5 = 0.4100 AB
Mean	4 = 0.5400 A	Mean 6 = 0.3100 ABC
Mean	5 = 0.4100 AB	Mean 2 = 0.2000 BC
Mean	6 = 0.3100 ABC	Mean 7 = 0.1900 BC
Mean	7 = 0.1900 BC	Mean 1 = 0.09000 C

Title: *Nitrosomonas* sp.

	3 lần lặp lại	12	24	36	48	60	72	96
Thời gian nuôi cấy (h) <i>Nitrosomonas</i> sp. (OD _{625nm})	L1	0,083	0,236	0,538	0,428	0,282	0,165	0,043
	L2	0,075	0,243	0,520	0,424	0,264	0,148	0,028
	L3	0,082	0,278	0,541	0,420	0,273	0,143	0,031
	TB	0,080	0,252	0,533	0,424	0,273	0,152	0,034

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 21.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: thoigian) with values from 1 to 7

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.250 Grand Sum = 5.245 Total Count = 21

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.254	1.775
2	*	0.243	1.702
3	*	0.253	1.768
*	1	0.080	0.240
*	2	0.252	0.757
*	3	0.533	1.599
*	4	0.424	1.272
*	5	0.273	0.819
*	6	0.152	0.456
*	7	0.034	0.102

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication	2	0.000	0.000	1.9433	0.1857	
2	Factor A	6	0.588	0.098	821.9683	0.0000
-3	Error	12	0.001	0.000		
Total	20	0.590				

1

Coefficient of Variation: 4.37%

Phân hạng ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của Nitrosomonas sp.

Error Mean Square = 0.009800

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.2997 at alpha = 0.010

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.08000 C	Mean	3 =	0.5300 A
Mean	2 =	0.2500 ABC	Mean	4 =	0.4200 AB
Mean	3 =	0.5300 A	Mean	5 =	0.2700 ABC
Mean	4 =	0.4200 AB	Mean	2 =	0.2500 ABC
Mean	5 =	0.2700 ABC	Mean	6 =	0.1500 BC
Mean	6 =	0.1500 BC	Mean	1 =	0.08000 C
Mean	7 =	0.03000 C	Mean	7 =	0.03000 C

Phụ lục 4. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các chủng

Title: *B. subtilis*

Các thang pH nuôi cấy <i>Bacillus subtilis</i> (OD _{625nm})	3 lần lặp lại	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	8,0	8,5
	L1	0,298	0,425	0,325	0,288	0,279	0,236	0,238
	L2	0,239	0,391	0,322	0,288	0,246	0,232	0,214
	L3	0,273	0,390	0,382	0,251	0,263	0,233	0,207
	TB	0,270	0,402	0,343	0,276	0,263	0,234	0,220

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

one Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 21.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: thangpH) with values from 1 to 7

Variable 3: OD_{625nm}

Grand Mean = 0.287 Grand Sum = 6.020 Total Count = 21

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.298	2.089
2	*	0.276	1.932
3	*	0.286	1.999
*	1	0.270	0.810
*	2	0.402	1.206
*	3	0.343	1.029
*	4	0.276	0.827
*	5	0.263	0.788
*	6	0.234	0.701
*	7	0.220	0.659

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
2	Replication	2	0.002	0.001	2.1046	0.1646
2	Factor A	6	0.074	0.012	29.3720	0.0000
-3	Error	12	0.005	0.000		
	Total	20	0.081			

Coefficient of Variation: 7.16%

Phân hạng ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của B.subtilis

Error Mean Square = 0.001200

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1049 at alpha = 0.010

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	0.2700	BC	Mean	2 =	0.4000	A
Mean	2 =	0.4000	A	Mean	3 =	0.3400	AB
Mean	3 =	0.3400	AB	Mean	4 =	0.2800	BC
Mean	4 =	0.2800	BC	Mean	1 =	0.2700	BC
Mean	5 =	0.2600	BC	Mean	5 =	0.2600	BC
Mean	6 =	0.2300	C	Mean	6 =	0.2300	C
Mean	7 =	0.2200	C	Mean	7 =	0.2200	C

Title: *L.acidophilus*

Các thang pH nuôi cấy <i>Lactobacillus acidophilus</i> (OD _{600nm})	3 lần lặp lại	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	8,0	8,5
	L1	0,556	0,699	0,477	0,387	0,282	0,132	0,083
	L2	0,573	0,674	0,476	0,386	0,288	0,143	0,098
	L3	0,549	0,701	0,475	0,382	0,275	0,137	0,097
	TB	0,559	0,691	0,476	0,385	0,282	0,137	0,093

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 21.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: thang pH) with values from 1 to 7

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.375 Grand Sum = 7.870 Total Count = 21

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.374	2.616
2	*	0.377	2.638
3	*	0.374	2.616
*	1	0.559	1.678
*	2	0.691	2.074
*	3	0.476	1.428
*	4	0.385	1.155
*	5	0.282	0.845
*	6	0.137	0.412
*	7	0.093	0.278

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication		2	0.000	0.000	0.2730	
2	Factor A	6	0.868	0.145	1712.8570	0.0000
-3	Error	12	0.001	0.000		
Total		20	0.869			

1

Coefficient of Variation: 2.45%

Phân hạng ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của L.acidophilus

Error Mean Square = 0.01450

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.3645 at alpha = 0.010

	Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	0.5600	AB	Mean 2 =	0.6900	A	
Mean 2 =	0.6900	A	Mean 1 =	0.5600	AB	
Mean 3 =	0.4800	ABC	Mean 3 =	0.4800	ABC	
Mean 4 =	0.3900	ABCD	Mean 4 =	0.3900	ABCD	
Mean 5 =	0.2800	BCD	Mean 5 =	0.2800	BCD	
Mean 6 =	0.1400	CD	Mean 6 =	0.1400	CD	
Mean 7 =	0.09000	D	Mean 7 =	0.09000	D	

Title: *S.cerevisiae*

Các thang pH nuôi cấy <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (OD _{610nm})	3 lần lặp lại	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	8,0	8,5
	L1	0,392	0,429	0,468	0,389	0,311	0,197	0,121
	L2	0,374	0,414	0,425	0,381	0,297	0,208	0,108
	L3	0,365	0,382	0,396	0,355	0,286	0,184	0,096
	TB	0,377	0,408	0,430	0,375	0,298	0,196	0,108

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 21.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: cacthangpH) with values from 1 to 7

Variable 3: OD610nm

Grand Mean = 0.313 Grand Sum = 6.578 Total Count = 21

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.330	2.307
2	*	0.315	2.207
3	*	0.295	2.064
* 1		0.377	1.131
* 2		0.408	1.225
* 3		0.430	1.289
* 4		0.375	1.125
* 5		0.298	0.894
* 6		0.196	0.589
* 7		0.108	0.325

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication	2	0.004	0.002	17.7470	0.0003	
2	Factor A	6	0.259	0.043	359.6347	0.0000
-3	Error	12	0.001	0.000		

1

Total 20 0.265

Coefficient of Variation: 3.50%

Phân hạng ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của *S.cerevisiae*

Error Mean Square = 0.004300

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1985 at alpha = 0.010

	Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.3800	AB	Mean	3 =	0.4300 A
Mean	2 =	0.4100	A	Mean	2 =	0.4100 A
Mean	3 =	0.4300	A	Mean	1 =	0.3800 AB
Mean	4 =	0.3800	AB	Mean	4 =	0.3800 AB
Mean	5 =	0.3000	ABC	Mean	5 =	0.3000 ABC
Mean	6 =	0.2000	BC	Mean	6 =	0.2000 BC
Mean	7 =	0.1100	C	Mean	7 =	0.1100 C

Title: *Nitrosomonas* sp.

Các thang pH nuôi cấy <i>Nitrosomonas</i> sp. (OD _{625nm})	3 lần lặp lại	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	8,0	8,5
	L1	0,301	0,516	0,481	0,367	0,289	0,128	0,072
	L2	0,313	0,537	0,437	0,338	0,264	0,164	0,062
	L3	0,309	0,561	0,469	0,346	0,278	0,139	0,041
	TB	0,308	0,538	0,462	0,350	0,277	0,144	0,058

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 21.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: pH) with values from 1 to 7

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.305 Grand Sum = 6.412 Total Count = 21

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.308	2.154
2	*	0.302	2.115
3	*	0.306	2.143
*	1	0.308	0.923
*	2	0.538	1.614
*	3	0.462	1.387
*	4	0.350	1.051
*	5	0.277	0.831
*	6	0.144	0.431
*	7	0.058	0.175

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication	2	0.000	0.000	0.1754		
2	Factor A	6	0.506	0.084	256.2285	0.0000
-3	Error	12	0.004	0.000		
Total	20	0.510				

1

Coefficient of Variation: 5.94%

Phân hạng ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của Nitrosomonas sp.

Error Mean Square = 0.008400

Error Degrees of Freedom = 6

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.2774 at alpha = 0.010

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	0.3100	ABC	Mean	2 =	0.5400	A
Mean	2 =	0.5400	A	Mean	3 =	0.4600	A
Mean	3 =	0.4600	A	Mean	4 =	0.3500	AB
Mean	4 =	0.3500	AB	Mean	1 =	0.3100	ABC
Mean	5 =	0.2800	ABC	Mean	5 =	0.2800	ABC
Mean	6 =	0.1400	BC	Mean	6 =	0.1400	BC
Mean	7 =	0.06000	C	Mean	7 =	0.06000	C

Phụ lục 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng

Title: *B. subtilis*

Nhiệt độ nuôi cấy <i>Bacillus subtilis</i> (OD _{625nm})	3 lần lặp lại	20 ⁰ C	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C	40 ⁰ C
	L1	0,338	0,374	0,591	0,408	0,398
	L2	0,297	0,350	0,576	0,392	0,355
	L3	0,312	0,387	0,604	0,415	0,364
	TB	0,316	0,370	0,590	0,405	0,372

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 15.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: cacthangnietdo) with values from 1 to

5

Variable 3: OD_{625nm}

Grand Mean = 0.411 Grand Sum = 6.161 Total Count = 15

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.422	2.109
2	*	0.394	1.970
3	*	0.416	2.082
*	1	0.316	0.947
*	2	0.370	1.111
*	3	0.590	1.771
*	4	0.405	1.215
*	5	0.372	1.117

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication	2	0.002	0.001	7.9614	0.0125	
2	Factor A	4	0.133	0.033	244.1995	0.0000
-3	Error	8	0.001	0.000		
Total	14	0.137				

Coefficient of Variation: 2.84%

Phân hạng ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của *B.subtilis*

Error Mean Square = 0.003300

Error Degrees of Freedom = 4

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.2160 at alpha = 0.010

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.3200 B	Mean	3 =	0.5900 A
Mean	2 =	0.3700 B	Mean	4 =	0.4100 AB
Mean	3 =	0.5900 A	Mean	5 =	0.3700 B
Mean	4 =	0.4100 AB	Mean	2 =	0.3700 B
Mean	5 =	0.3700 B	Mean	1 =	0.3200 B

Title: *L.acidophilus*

Nhiệt độ nuôi cấy <i>Lactobacillus acidophilus</i> (OD _{600nm})	3 lần lặp lại	20 ⁰ C	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C	40 ⁰ C
	L1	0,016	0,212	0,605	0,664	0,365
	L2	0,019	0,241	0,622	0,708	0,357
	L3	0,016	0,219	0,613	0,695	0,351
	TB	0,017	0,224	0,613	0,689	0,358

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 15.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: nhietdo) with values from 1 to 5

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.380 Grand Sum = 5.703 Total Count = 15

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.372	1.862
2	*	0.389	1.947
3	*	0.379	1.894
*	1	0.017	0.051
*	2	0.224	0.672
*	3	0.613	1.840
*	4	0.689	2.067
*	5	0.358	1.073

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication		2	0.001	0.000	2.9722	0.1083
2	Factor A	4	0.920	0.230	1853.7549	0.0000
-3	Error	8	0.001	0.000		
Total		14	0.921			

Phân hạng ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của *L.acidophilus*

Error Mean Square = 0.02300

Error Degrees of Freedom = 4

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.5701 at alpha = 0.010

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.02000 B	Mean	4 =	0.6900 A
Mean	2 =	0.2200 AB	Mean	3 =	0.6100 A
Mean	3 =	0.6100 A	Mean	5 =	0.3600 AB
Mean	4 =	0.6900 A	Mean	2 =	0.2200 AB
Mean	5 =	0.3600 AB	Mean	1 =	0.02000 B

Title: *S.cerevisiae*

Nhiệt độ nuôi cấy <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (OD _{610nm})	3 lần lặp lại	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
	L1	0,134	0,370	0,574	0,482	0,245
	L2	0,117	0,401	0,589	0,492	0,246
	L3	0,128	0,374	0,608	0,471	0,261
	TB	0,126	0,382	0,590	0,482	0,251

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 15.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: cachangnhietdo) with values from 1 to

5

Variable 3: OD610nm

Grand Mean = 0.366 Grand Sum = 5.492 Total Count = 15

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.361	1.805
2	*	0.369	1.845
3	*	0.368	1.842
*	1	0.126	0.379
*	2	0.382	1.145
*	3	0.590	1.771
*	4	0.482	1.445
*	5	0.251	0.752

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication		2	0.000	0.000	0.5363	
2	Factor A	4	0.404	0.101	545.7516	0.0000
-3	Error	8	0.001	0.000		
Total		14	0.406			

Phân hạng ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của *S.cerevisiae*

Error Mean Square = 0.01010

Error Degrees of Freedom = 4

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.3778 at alpha = 0.010

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	0.1300 B	Mean	3 =	0.5900 A
Mean	2 =	0.3800 AB	Mean	4 =	0.4800 AB
Mean	3 =	0.5900 A	Mean	2 =	0.3800 AB
Mean	4 =	0.4800 AB	Mean	5 =	0.2500 AB
Mean	5 =	0.2500 AB	Mean	1 =	0.1300 B

Title: *Nitrosomonas* sp.

	3 lần lặp lại	20 ⁰ C	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C	40 ⁰ C
Nhiệt độ nuôi cấy <i>Nitrosomonas</i> sp. (OD _{625nm})	L1	0,203	0,249	0,538	0,476	0,054
	L2	0,216	0,268	0,569	0,482	0,048
	L3	0,186	0,243	0,560	0,479	0,073
	TB	0,202	0,253	0,556	0,479	0,058

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 15.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: nhietdo) with values from 1 to 5

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.310 Grand Sum = 4.644 Total Count = 15

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.304	1.520
2	*	0.317	1.583
3	*	0.308	1.541
*	1	0.202	0.605
*	2	0.253	0.760
*	3	0.556	1.667
*	4	0.479	1.437
*	5	0.058	0.175

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication	2	0.000	0.000	1.3181	0.3200	
2	Factor A	4	0.502	0.125	803.1385	0.0000
-3	Error	8	0.001	0.000		
Total	14	0.503				

Coefficient of Variation: 4.04%

Phân hạng ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của Nitrosomonas sp.

Error Mean Square = 0.001250

Error Degrees of Freedom = 4

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1329 at alpha = 0.010

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	0.2000	B	Mean 3 =	0.5600	A
Mean 2 =	0.2500	B	Mean 4 =	0.4800	A
Mean 3 =	0.5600	A	Mean 2 =	0.2500	B
Mean 4 =	0.4800	A	Mean 1 =	0.2000	B
Mean 5 =	0.06000	C	Mean 5 =	0.06000	C

Phụ lục 6. Ảnh hưởng của độ lắc đến sinh trưởng của các chủng

Title: *B. subtilis*

Độ lắc nuôi cấy (rpm)	3 lần lặp lại	0	100	150	200	250
<i>Bacillus subtilis</i> (OD _{625nm})	L1	0,569	0,613	0,671	0,941	0,647
	L2	0,593	0,571	0,673	0,931	0,632
	L3	0,511	0,605	0,671	0,926	0,621
	TB	0,558	0,596	0,672	0,933	0,633

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 15.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: dolac) with values from 1 to 5

Variable 3: OD_{625nm}

Grand Mean = 0.677 Grand Sum = 10.155 Total Count = 15

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.684	3.421
2	*	0.680	3.400
3	*	0.667	3.334
*	1	0.558	1.673
*	2	0.590	1.769
*	3	0.672	2.015
*	4	0.933	2.798
*	5	0.633	1.900

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication	2	0.001	0.000	0.8712		
2	Factor A	4	0.268	0.067	141.3523	0.0000
-3	Error	8	0.004	0.000		

Total	14	0.272				

1

Coefficient of Variation: 3.21%

Phân hạng ảnh hưởng của độ lắc đến sinh trưởng của B.subtilis

Error Mean Square = 0.006700

Error Degrees of Freedom = 4

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.3077 at alpha = 0.010

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	0.5600	B	Mean	4 =	0.9300	A
Mean	2 =	0.5900	B	Mean	3 =	0.6700	AB
Mean	3 =	0.6700	AB	Mean	5 =	0.6300	AB
Mean	4 =	0.9300	A	Mean	2 =	0.5900	B
Mean	5 =	0.6300	AB	Mean	1 =	0.5600	B

Title: *L.acidophilus*

Độ lắc nuôi cấy (rpm) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (OD _{600nm})	3 lần lặp lại	0	100	150	200	250
	L1	0,691	0,854	0,935	0,548	0,286
	L2	0,684	0,838	0,929	0,545	0,274
	L3	0,724	0,842	0,961	0,549	0,278
	TB	0,700	0,845	0,942	0,547	0,279

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 15.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: dolac) with values from 1 to 5

Variable 3: OD

Grand Mean = 0.663 Grand Sum = 9.938 Total Count = 15

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.663	3.314
2	*	0.654	3.270
3	*	0.671	3.354
* 1		0.700	2.099
* 2		0.845	2.534
* 3		0.942	2.825
* 4		0.547	1.642
* 5		0.279	0.838

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication	2	0.001	0.000	2.8043	0.1194	
2	Factor A	4	0.818	0.204	1623.7911	0.0000
-3	Error	8	0.001	0.000		
Total	14	0.819				

1

Coefficient of Variation: 1.69%

Phân hạng ảnh hưởng của độ lắc đến sinh trưởng của L.acidophilus

Error Mean Square = 0.02040

Error Degrees of Freedom = 4

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.5369 at alpha = 0.010

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 0.7000 AB	Mean 3 = 0.9600 A
Mean 2 = 0.8400 A	Mean 2 = 0.8400 A
Mean 3 = 0.9600 A	Mean 1 = 0.7000 AB
Mean 4 = 0.5500 AB	Mean 4 = 0.5500 AB
Mean 5 = 0.2800 B	Mean 5 = 0.2800 B

Title: *S.cerevisiae*

Độ lắc nuôi cấy (rpm) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (OD _{610nm})	3 lần lặp lại	0	100	150	200	250
	L1	0,549	0,823	0,971	0,846	0,810
	L2	0,550	0,818	0,971	0,816	0,787
	L3	0,510	0,797	0,969	0,808	0,796
	TB	0,536	0,813	0,970	0,823	0,798

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 15.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: dolac) with values from 1 to 5

Variable 3: OD610nm

Grand Mean = 0.788 Grand Sum = 11.821 Total Count = 15

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.800	3.999
2	*	0.788	3.942
3	*	0.776	3.880
*	1	0.536	1.609
*	2	0.813	2.438
*	3	0.970	2.911
*	4	0.823	2.470
*	5	0.798	2.393

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
1	Replication	2	0.001	0.001	5.2557	0.0349
2	Factor A	4	0.296	0.074	548.2111	0.0000
-3	Error	8	0.001	0.000		
Total		14	0.298			

Coefficient of Variation: 1.47%

Phân hạng ảnh hưởng của độ lắc đến sinh trưởng của *S.cerevisiae*

Error Mean Square = 0.007400

Error Degrees of Freedom = 4

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.3234 at alpha = 0.010

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 0.5400 B	Mean 3 = 0.9700 A
Mean 2 = 0.8100 AB	Mean 4 = 0.8200 AB
Mean 3 = 0.9700 A	Mean 2 = 0.8100 AB
Mean 4 = 0.8200 AB	Mean 5 = 0.8000 AB
Mean 5 = 0.8000 AB	Mean 1 = 0.5400 B

Title: *Nitrosomonas* sp.

Độ lắc nuôi cấy (rpm)	3 lần lặp lại	0	100	150	200	250
<i>Nitrosomonas</i> sp. (OD _{625nm})	L1	0,538	0,672	0,853	0,331	0,168
	L2	0,520	0,654	0,884	0,347	0,172
	L3	0,541	0,681	0,869	0,349	0,155
	TB	0,533	0,669	0,869	0,342	0,165

Function: FACTOR
 Experiment Model Number 7:
 One Factor Randomized Complete Block Design
 Data case no. 1 to 15.
 Factorial ANOVA for the factors:
 Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to

3

Factor A (Var 2: dolac) with values from 1 to 5
 Variable 3: OD
 Grand Mean = 0.516 Grand Sum = 7.734 Total Count = 15

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	0.512	2.562
2	*	0.515	2.577
3	*	0.519	2.595
*	1	0.533	1.599
*	2	0.669	2.007
*	3	0.869	2.606
*	4	0.342	1.027
*	5	0.165	0.495

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication		2	0.000	0.000	0.3211	
2	Factor A	4	0.904	0.226	1329.7160	0.0000
-3	Error	8	0.001	0.000		
Total		14	0.906			

Coefficient of Variation: 2.53%
Phân hạng ảnh hưởng của độ lắ đến sinh trưởng của Nitrosomonas sp.
 Error Mean Square = 0.002260
 Error Degrees of Freedom = 4
 No. of observations to calculate a mean = 3
 Least Significant Difference Test
 LSD value = 0.1787 at alpha = 0.010

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	0.5300	B	Mean	3 =	0.8700	A
Mean	2 =	0.6700	B	Mean	2 =	0.6700	B
Mean	3 =	0.8700	A	Mean	1 =	0.5300	B
Mean	4 =	0.3400	C	Mean	4 =	0.3400	C
Mean	5 =	0.1700	C	Mean	5 =	0.1700	C

Phụ lục 7. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến sinh trưởng của các chủng
- *B.subtilis*

Thời gian (tháng)	Số khuẩn lạc ở các độ pha loãng			Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)
	LLL	10^{-7}	10^{-8}	
1	1	135	45	$1,5 \times 10^{10}$
	2	137		
2	1	99	30	$1,1 \times 10^{10}$
	2	105		
3	1	82	22	$9,0 \times 10^9$
	2	85		
4	1	66	17	$7,3 \times 10^9$
	2	71		
5	1	56	10	$5,9 \times 10^9$
	2	58		
6	1	45	7	$4,6 \times 10^9$
	2	46		

- *L.acidophilus*

Thời gian (tháng)	Số khuẩn lạc ở các độ pha loãng			Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)
	LLL	10^{-7}	10^{-8}	
1	1	124	37	$1,4 \times 10^{10}$
	2	131		
2	1	109	31	$1,2 \times 10^{10}$
	2	112		
3	1	86	26	$9,7 \times 10^9$
	2	93		
4	1	70	19	$7,9 \times 10^9$
	2	78		
5	1	52	11	$5,6 \times 10^9$
	2	55		
6	1	39	6	$4,1 \times 10^9$
	2	41		

- *S.cerevisiae*

Thời gian (tháng)	Số khuẩn lạc ở các độ pha loãng			Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)
	LLL	10^{-7}	10^{-8}	
1	1	120	31	$1,3 \times 10^{10}$
	2	125		
2	1	85	22	$9,3 \times 10^9$
	2	89		
3	1	78	15	$8,2 \times 10^9$
	2	80		
4	1	51	12	$5,6 \times 10^9$
	2	55		
5	1	46	10	$4,9 \times 10^9$
	2	48		
6	1	39	7	$4,2 \times 10^9$
	2	42		

- *Nitrosomonas* sp.

Thời gian (tháng)	Số khuẩn lạc ở các độ pha loãng			Tổng mật độ khuẩn lạc (CFU/ml)
	LLL	10^{-7}	10^{-8}	
1	1	105	32	$1,1 \times 10^{10}$
	2	98		
2	1	85	27	$9,5 \times 10^9$
	2	89		
3	1	74	20	$8,1 \times 10^9$
	2	76		
4	1	57	16	$6,4 \times 10^9$
	2	61		
5	1	39	9	$4,5 \times 10^9$
	2	46		
6	1	25	4	$2,7 \times 10^9$
	2	27		

*Phụ lục 8: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics trong chăn nuôi gà
Ảnh hưởng đến số lượng trứng*

Số lượng trứng TB/ô/tháng	ĐC			CT1			CT2		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
1	420	427	429	442	446	448	456	462	463
2	421	430	433	445	448	449	459	461	464
3	426	429	435	449	451	451	462	465	466
4	428	431	435	451	451	452	465	465	466
5	428	431	437	452	453	454	466	469	469
6	434	436	436	455	455	456	469	470	471

Title: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 54.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: thang) with values from 1 to 18

Variable 3: soluongtrung

Grand Mean = 448.370 Grand Sum = 24212.000 Total Count =

54

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	446.000	8028.000
2	*	448.889	8080.000
3	*	450.222	8104.000
* 1		425.333	1276.000
* 2		428.000	1284.000
* 3		430.000	1290.000
* 4		431.333	1294.000
* 5		428.667	1286.000
* 6		435.333	1306.000
* 7		445.333	1336.000
* 8		447.333	1342.000
* 9		450.333	1351.000
* 10		451.333	1354.000
* 11		453.000	1359.000
* 12		455.333	1366.000
* 13		460.333	1381.000
* 14		461.333	1384.000
* 15		464.333	1393.000
* 16		465.333	1396.000

* 17 468.000 1404.000
 * 18 470.000 1410.000

 A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
Replication		2	167.704	83.852	22.8145	0.0000
2	Factor A	17	11793.926	693.760	188.7587	0.0000
-3	Error	34	124.963	3.675		
Total		53	12086.593			

Coefficient of Variation: 0.43%

Phân hạng ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng trứng

Error Mean Square = 69.38

Error Degrees of Freedom = 17

No. of observations to calculate a mean = 3

Duncan's Multiple Range Test

LSD value = 19.71

$s_x = 4.809$ at $\alpha = 0.010$

	Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	425.0	H	Mean 18 =	470.0	A	
Mean 2 =	428.0	GH	Mean 17 =	468.0	AB	
Mean 3 =	430.0	FGH	Mean 16 =	465.0	ABC	
Mean 4 =	431.0	EFGH	Mean 15 =	464.0	ABC	
Mean 5 =	428.0	GH	Mean 14 =	461.0	ABC	
Mean 6 =	435.0	DEFGH	Mean 13 =	460.0	ABC	
Mean 7 =	445.0	CDEFGH	Mean 12 =	455.0	ABCD	
Mean 8 =	447.0	BCDEFGH	Mean 11 =	453.0	ABCDE	
Mean 9 =	450.0	ABCDEF	Mean 10 =	451.0	ABCDEF	
Mean 10 =	451.0	ABCDEF	Mean 9 =	450.0	ABCDEF	
Mean 11 =	453.0	ABCDE	Mean 8 =	447.0	BCDEFGH	
Mean 12 =	455.0	ABCD	Mean 7 =	445.0	CDEFGH	
Mean 13 =	460.0	ABC	Mean 6 =	435.0	DEFGH	
Mean 14 =	461.0	ABC	Mean 4 =	431.0	EFGH	
Mean 15 =	464.0	ABC	Mean 3 =	430.0	FGH	
Mean 16 =	465.0	ABC	Mean 5 =	428.0	GH	
Mean 17 =	468.0	AB	Mean 2 =	428.0	GH	
Mean 18 =	470.0	A	Mean 1 =	425.0	H	

Ảnh hưởng đến khối lượng trứng

Khối lượng trứng TB/300 quả/tháng	ĐC			CT1			CT2		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
1	18,4	18,5	18,6	19,0	19,0	19,0	19,8	19,8	19,9
2	18,7	18,6	18,8	19,1	19,1	19,2	19,9	19,8	20,0
3	18,5	18,4	18,5	19,2	19,1	19,3	20,0	20,0	20,1
4	18,5	18,8	18,6	19,3	19,3	19,3	20,1	20,2	20,1
5	18,6	18,7	18,7	19,3	19,4	19,5	20,2	20,2	20,3
6	18,8	18,9	18,8	19,5	19,5	19,6	20,3	20,3	20,3

Title: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khối lượng trứng

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 54.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to 3

Factor A (Var 2: thang) with values from 1 to 18

Variable 3: khoiluongtrung

Grand Mean = 19.322 Grand Sum = 1043.400 Total Count

= 54

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	19.289	347.200
2	*	19.311	347.600
3	*	19.367	348.600
*	1	18.500	55.500
*	2	18.700	56.100
*	3	18.467	55.400
*	4	18.633	55.900
*	5	18.667	56.000
*	6	18.833	56.500
*	7	19.000	57.000
*	8	19.133	57.400
*	9	19.200	57.600
*	10	19.300	57.900
*	11	19.400	58.200
*	12	19.533	58.600
*	13	19.833	59.500
*	14	19.900	59.700
*	15	20.033	60.100
*	16	20.133	60.400
*	17	20.233	60.700
*	18	20.300	60.900

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F	Prob
2	Replication	2	0.058	0.029	6.5970	0.0038
2	Factor A	17	20.067	1.180	269.5523	0.0000
-3	Error	34	0.149	0.004		
	Total	53	20.273			

Coefficient of Variation: 0.34%

Phân hạng ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến khối lượng trứng

Error Mean Square = 0.1180

Error Degrees of Freedom = 17

No. of observations to calculate a mean = 3

Duncan's Multiple Range Test

LSD value = 0.8129

s_ = 0.1983 at alpha = 0.010

x

	Original Order				Ranked Order		
Mean	1 =	18.50	G	Mean	18 =	20.30	A
Mean	2 =	18.70	FG	Mean	17 =	20.20	AB
Mean	3 =	18.50	G	Mean	16 =	20.10	ABC
Mean	4 =	18.60	FG	Mean	15 =	20.00	ABCD
Mean	5 =	18.70	FG	Mean	14 =	19.90	ABCDE
Mean	6 =	18.80	FG	Mean	13 =	19.80	ABCDE
Mean	7 =	19.00	EFG	Mean	12 =	19.50	ABCDEF
Mean	8 =	19.10	DEFG	Mean	11 =	19.40	ABCDEFG
Mean	9 =	19.20	CDEFG	Mean	10 =	19.30	BCDEFG
Mean	10 =	19.30	BCDEFG	Mean	9 =	19.20	CDEFG
Mean	11 =	19.40	ABCDEFG	Mean	8 =	19.10	DEFG
Mean	12 =	19.50	ABCDEF	Mean	7 =	19.00	EFG
Mean	13 =	19.80	ABCDE	Mean	6 =	18.80	FG
Mean	14 =	19.90	ABCDE	Mean	5 =	18.70	FG
Mean	15 =	20.00	ABCD	Mean	2 =	18.70	FG
Mean	16 =	20.10	ABC	Mean	4 =	18.60	FG
Mean	17 =	20.20	AB	Mean	3 =	18.50	G
Mean	18 =	20.30	A	Mean	1 =	18.50	G

Khả năng kháng bệnh của gà đẻ trứng trong thời gian theo dõi

Số con gà nhiễm bệnh TB/ô/tháng	ĐC			CT1			CT2		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
1	201	209	215	151	155	157	109	108	99
2	151	142	149	101	97	96	85	83	79
3	159	165	168	79	74	73	71	66	65
4	151	148	157	68	66	65	52	51	45
5	201	192	187	47	44	39	37	34	33
6	184	187	185	34	33	27	21	18	18

Title: Ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến số lượng gà đẻ trứng bị nhiễm bệnh

Function: FACTOR

Experiment Model Number 7:

One Factor Randomized Complete Block Design

Data case no. 1 to 54.

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (Var 1: lanlaplai) with values from 1 to

3

Factor A (Var 2: thang) with values from 1 to 18

Variable 3: nhiembenh

Grand Mean = 104.278 Grand Sum = 5631.000 Total Count = 54

T A B L E O F M E A N S

1	2	3	Total
1	*	105.667	1902.000
2	*	104.000	1872.000
3	*	103.167	1857.000
*	1	208.333	625.000
*	2	147.333	442.000
*	3	164.000	492.000
*	4	152.000	456.000
*	5	193.333	580.000
*	6	185.333	556.000
*	7	154.333	463.000
*	8	98.000	294.000
*	9	75.333	226.000
*	10	66.333	199.000
*	11	43.333	130.000
*	12	31.333	94.000
*	13	105.333	316.000
*	14	82.333	247.000
*	15	67.333	202.000
*	16	49.333	148.000
*	17	34.667	104.000
*	18	19.000	57.000

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square
	1	Replication	2	58.333
29.167	1.8467	0.1732		
	2	Factor A	17	191605.500
713.6145	0.0000			
	-3	Error	34	537.000
				15.794
		Total	53	192200.833
				Coefficient of Variation: 3.81%

Phân hạng ảnh hưởng của chế phẩm probiotics đến đến số lượng gà đẻ trứng bị nhiễm bệnh

Error Mean Square = 1127.

Error Degrees of Freedom = 17

No. of observations to calculate a mean = 3

Duncan's Multiple Range Test

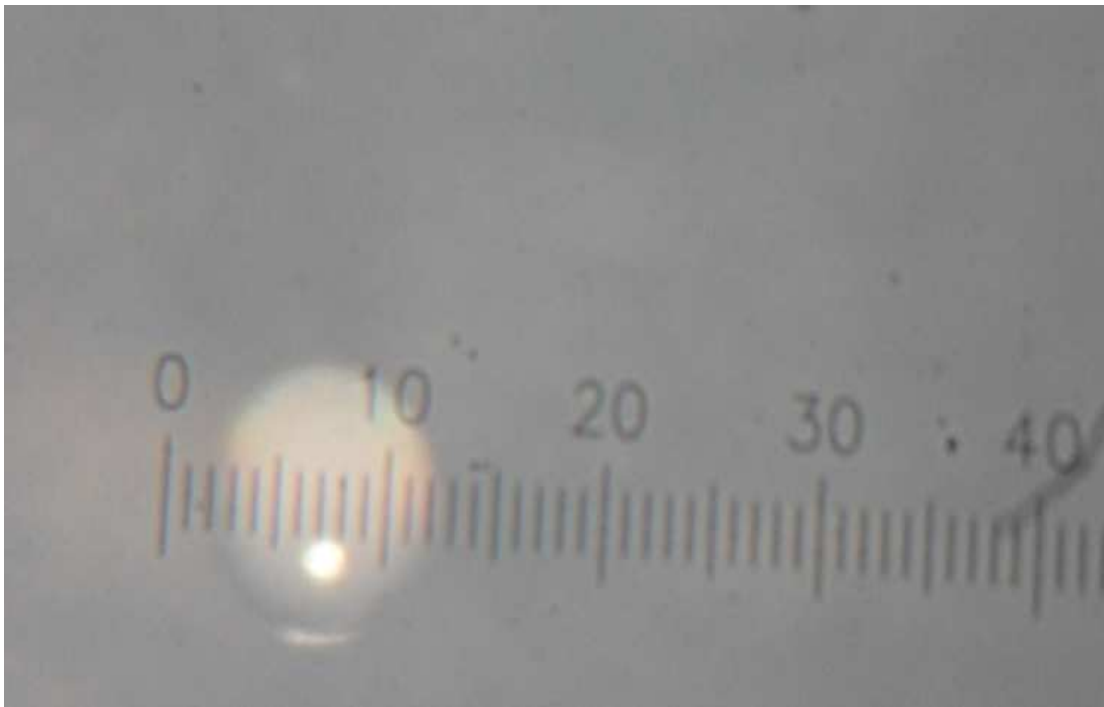
LSD value = 79.45

$s_{\bar{x}} = 19.38$ at $\alpha = 0.010$

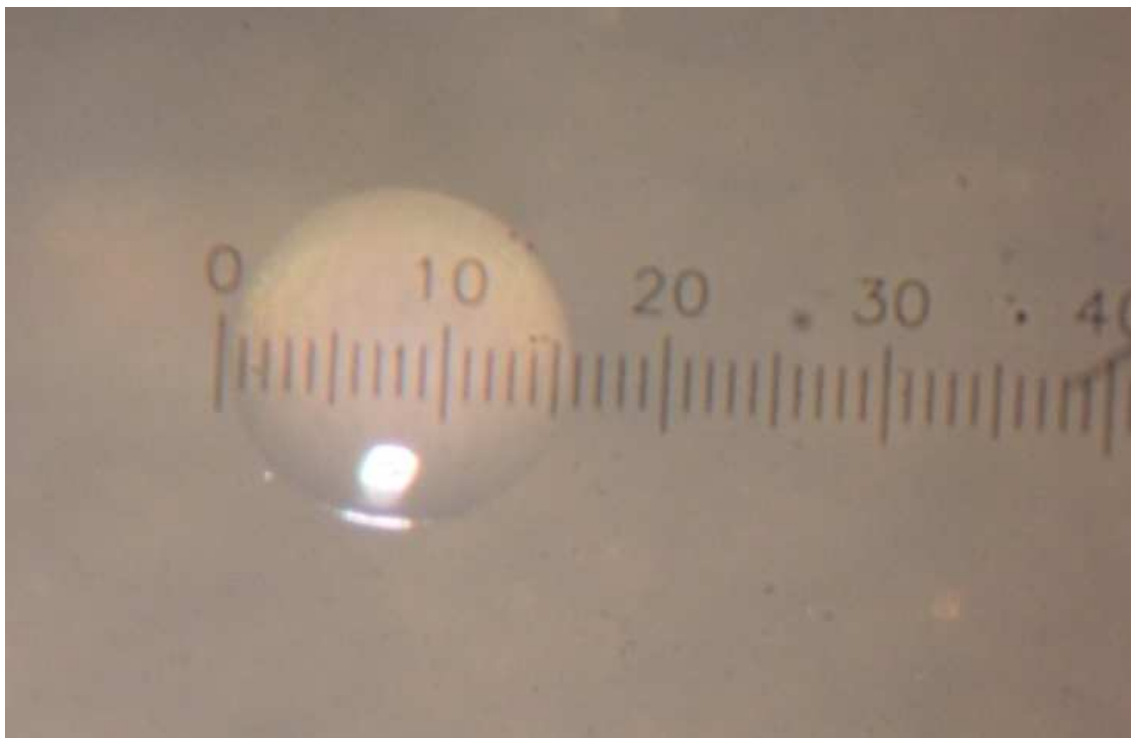
x

	Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	208.0	A	Mean 1 =	208.0	A	
Mean 2 =	147.0	ABCDE	Mean 5 =	193.0	AB	
Mean 3 =	164.0	ABCD	Mean 6 =	185.0	ABC	
Mean 4 =	152.0	ABCDE	Mean 3 =	164.0	ABCD	
Mean 5 =	193.0	AB	Mean 7 =	154.0	ABCDE	
Mean 6 =	185.0	ABC	Mean 4 =	152.0	ABCDE	
Mean 7 =	154.0	ABCDE	Mean 2 =	147.0	ABCDE	
Mean 8 =	98.00	CDEF	Mean 13 =	105.0	BCDEF	
Mean 9 =	75.00	DEF	Mean 8 =	98.00	CDEF	
Mean 10 =	66.00	EF	Mean 14 =	82.00	DEF	
Mean 11 =	43.00	F	Mean 9 =	75.00	DEF	
Mean 12 =	31.00	F	Mean 15 =	67.00	EF	
Mean 13 =	105.0	BCDEF	Mean 10 =	66.00	EF	
Mean 14 =	82.00	DEF	Mean 16 =	49.00	F	
Mean 15 =	67.00	EF	Mean 11 =	43.00	F	
Mean 16 =	49.00	F	Mean 17 =	34.00	F	
Mean 17 =	34.00	F	Mean 12 =	31.00	F	
Mean 18 =	19.00	F	Mean 18 =	19.00	F	

MỘT SỐ HÌNH ẢNH CỦA ĐỀ TÀI



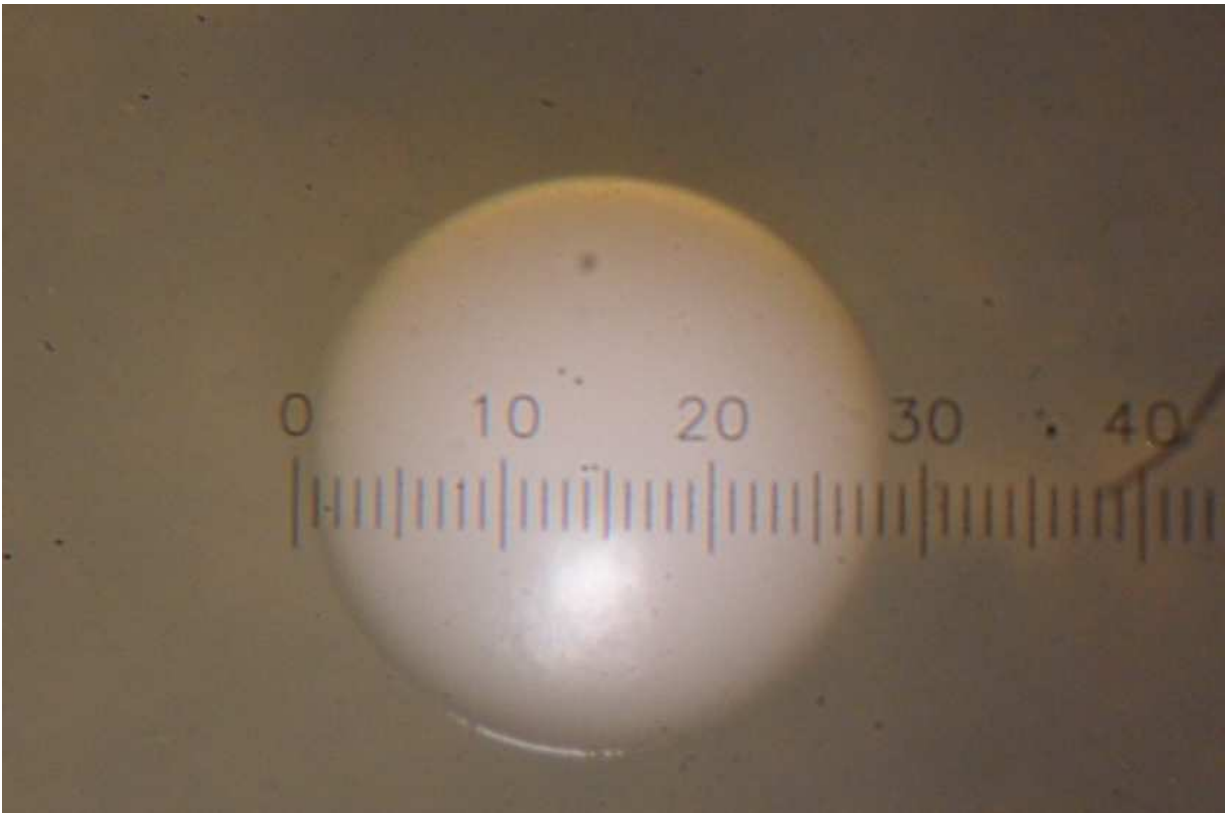
Hình 1: Khuẩn lạc của *B.subtilis*



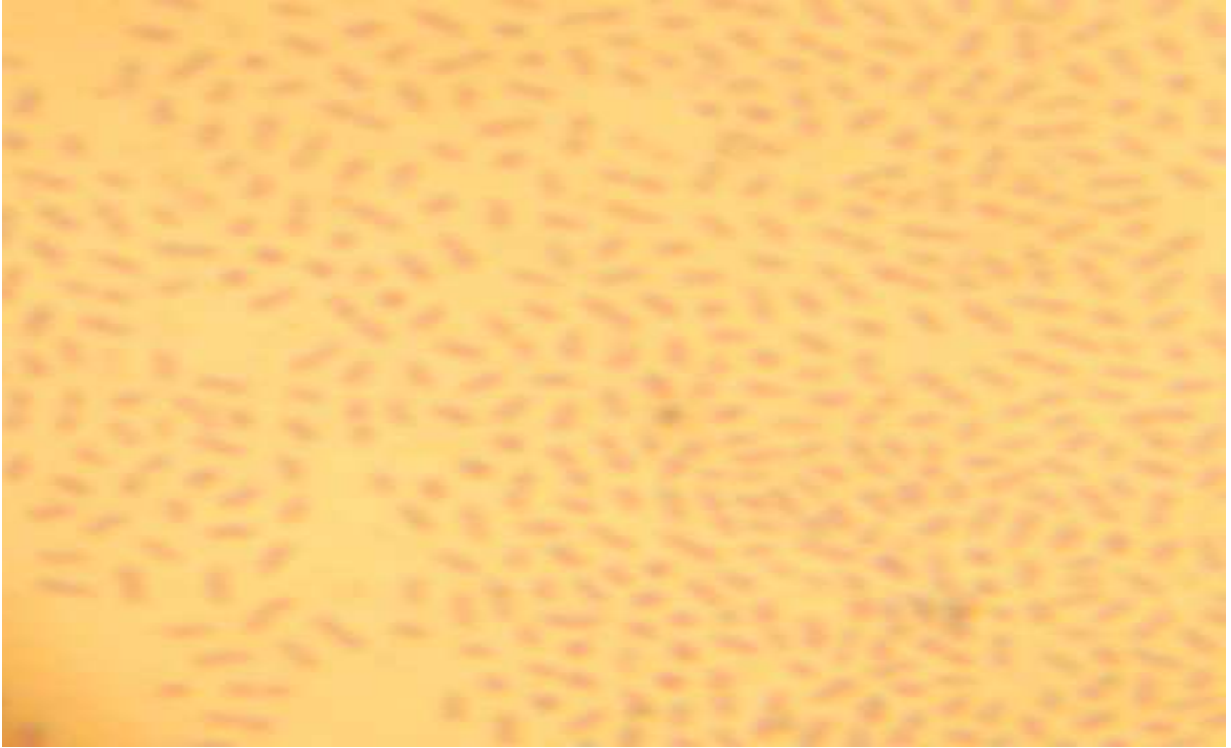
Hình 2: Khuẩn lạc của *L.acidophilus*



Hình 3: Khuẩn lạc của *Nitrosomonas* sp.



Hình 4: Khuẩn lạc của *S. cerevisiae*



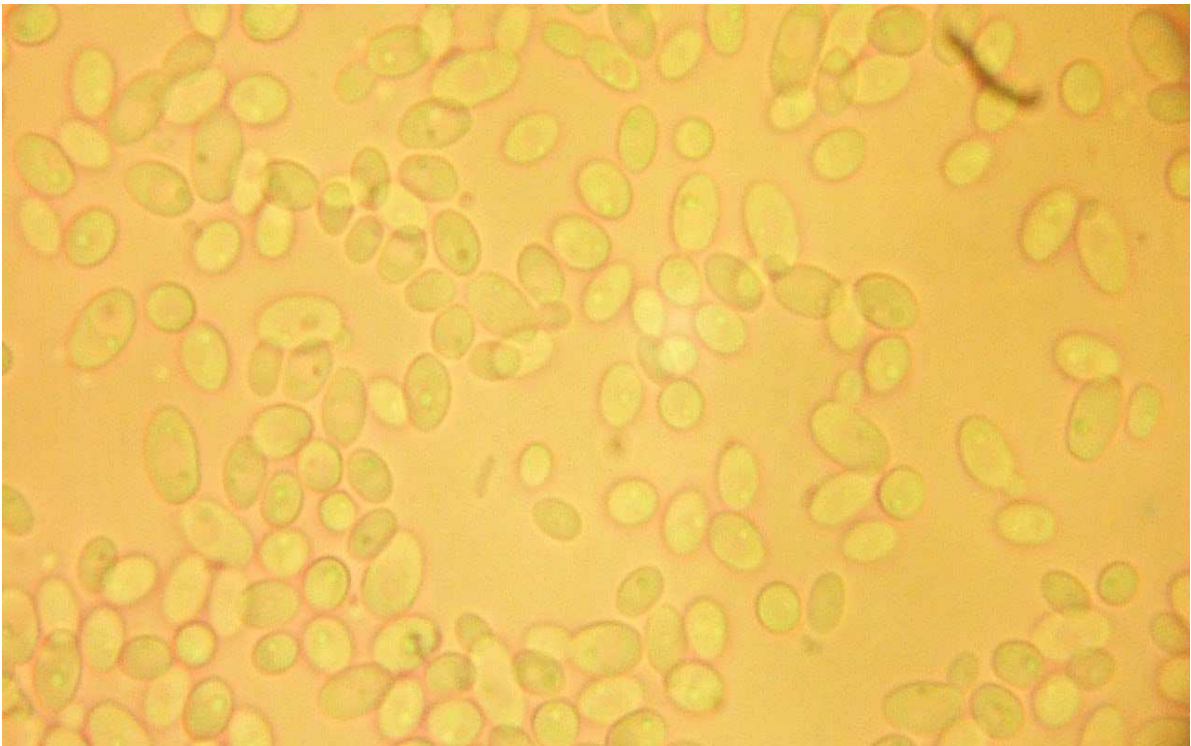
Hình 5: Hình thái tế bào của *B.subtilis*



Hình 6: Hình thái tế bào của *L.acidophilus*



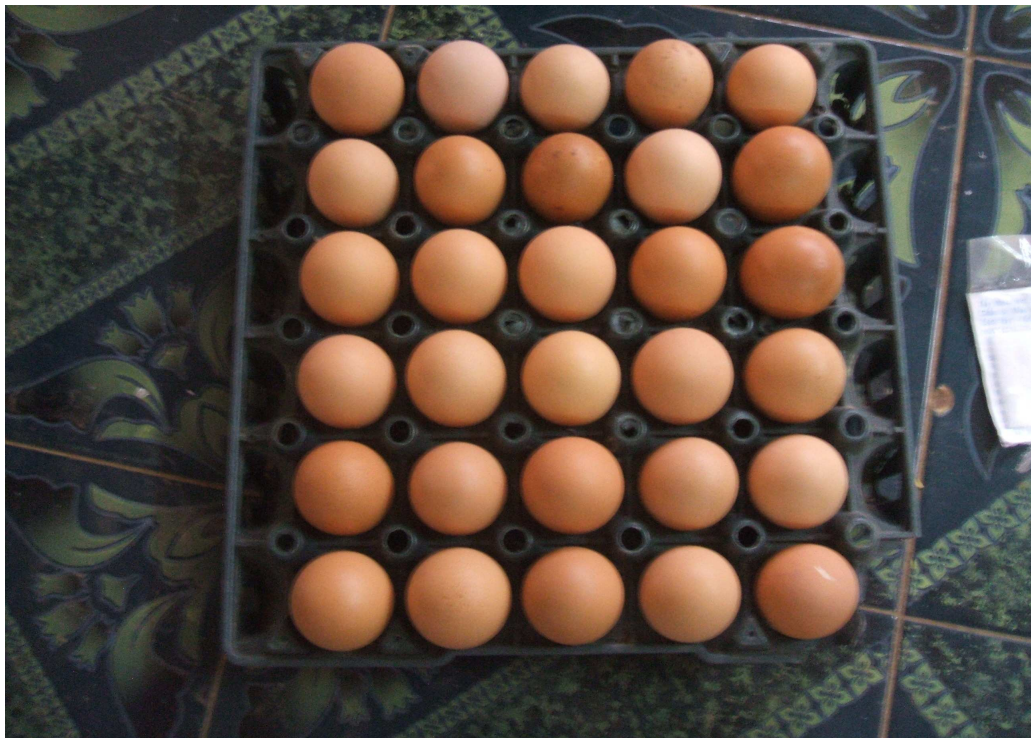
Hình 7: Hình thái tế bào của *Nitrosomonas* sp.



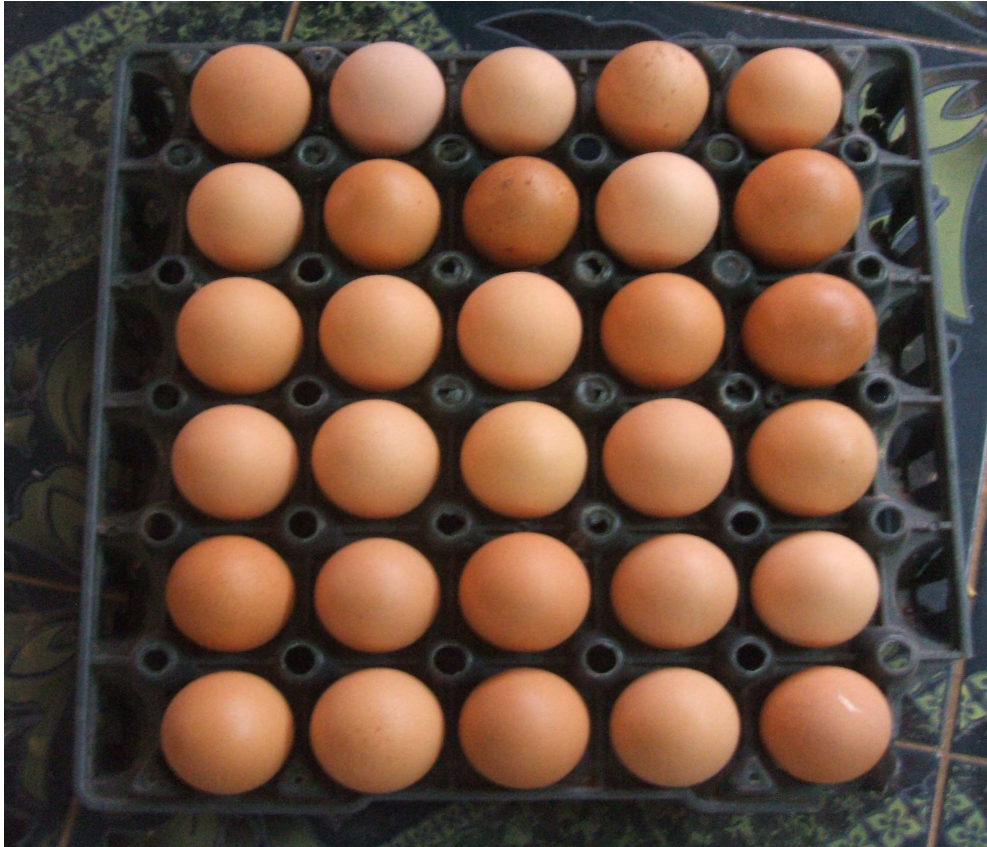
Hình 8: Hình thái tế bào của *S.cerevisiae*



Hình 9: Các lô thí nghiệm để kiểm tra hiệu quả của chế phẩm probiotics



Hình 10: Trứng thu được ở lô đối chứng



Hình 11: Trứng thu được sau khi cho gà sử dụng chế phẩm probiotics lô CT1



Hình 12: Trứng thu được sau khi cho gà sử dụng chế phẩm probiotics lô CT2

Xác nhận của cán bộ hướng dẫn khoa học

Học viên thực hiện

PGS.TS. Nguyễn Anh Dũng

Phùng Diệp Lại

Xác nhận của Chủ tịch hội đồng

TS. Nguyễn Tấn Vui