

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG LACTOBACILLUS CÓ KHẢ NĂNG SINH AXIT LACTIC CAO TỪ CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH THÁI NGUYÊN ĐỂ CHẾ TẠO CHẾ PHẨM SINH HỌC (PROBIOTIC) SỬ DỤNG CHO VẬT NUÔI.

TỔNG QUAN

Ngoài nước:

Việc sử dụng probiotics đã được biết đến từ lâu, nhưng việc nghiên cứu hệ vi sinh vật đường ruột và sử dụng probiotic mới thực sự phát triển từ những năm 80 của thế kỷ 20 (Patterson và cộng sự, 2003). Bằng kỹ thuật phân tử, các nhà nghiên cứu đã chỉ ra rằng chỉ có khoảng 20 đến 50% số loài vi sinh vật đường ruột ở động vật được phân lập, nuôi cấy và đánh giá có đặc tính probiotic (Patterson và cộng sự, 2003; Apajjalahti và cộng sự, 1998; Netherwood và cộng sự, 1999; Gong và cộng sự, 2002; Zhu và cộng sự, 2002), các nhà khoa học đã sử dụng kỹ thuật phân tử để nghiên cứu sự thay đổi cấu trúc quần thể và đặc điểm sinh học của hệ vi sinh vật đường ruột ở động vật dưới tác động của probiotic. Tuy nhiên, cho đến nay những nhân tố nào góp phần tạo nên một hệ vi sinh vật cân bằng hoặc làm rối loạn sự cân bằng của hệ vi sinh vật đường ruột cũng chưa được hiểu biết đầy đủ (Patterson và cộng sự, 2003). Đã có rất nhiều nghiên cứu về vai trò của probiotic đối với sức khỏe vật nuôi đối với hệ thống miễn dịch ở niêm mạc ruột (Schat và cộng sự, 1991; Hersbberg và cộng sự, 2000); Đối với sự thay đổi của niêm mạc ruột non ở vật nuôi (Glick, 1995; Fontaine và cộng sự, 1996; Dai và cộng sự, 2000; McCracken và cộng sự, 2001).

Những ảnh hưởng có lợi của probiotic thể hiện ở nhiều khía cạnh khác nhau nhưng những hiểu biết của con người về cơ chế tác động của probiotic còn rất hạn chế. Có một số tác giả cho rằng hiệu quả của probiotic trong việc ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh trong hệ tiêu hóa của động vật có ý nghĩa rất quan trọng. Sự kìm hãm đó được thực hiện theo những cách sau: cạnh tranh chất dinh dưỡng, sản xuất độc tố và các sản phẩm trao đổi (các axit béo bay hơi, các chất giống kháng sinh...), cạnh tranh vị trí bám dính ở niêm mạc ruột và kích thích hệ thống miễn dịch ruột (Fuller, 1989; Gibson và cộng sự, 2000; Rolfe, 2000; Knight và cộng sự, 2009).

Trong khoảng 20 năm trở lại đây, nhờ ứng dụng những tiến bộ kỹ thuật trong lĩnh vực sinh học phân tử, đặc biệt là kỹ thuật đọc trình tự axit nucleic trong nghiên cứu phân loại và định danh các chủng vi sinh vật, công nghệ sản xuất các sản phẩm probiotic phục vụ chăn nuôi ngày càng trở nên dễ dàng và phổ biến hơn ở nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu về sử dụng các sản phẩm probiotic trong chăn nuôi rất khác nhau, đôi khi trái ngược nhau. Nhiều nghiên cứu bổ sung chế phẩm probiotic trên lợn và gà cho thấy có đáp ứng tích cực (Henrich và cộng sự, 2006) như: (i) Tăng cường khả năng miễn dịch ở lợn con; (ii) Tăng tỷ lệ tiêu hóa các chất dinh dưỡng; (iii) Tăng hiệu quả sử dụng thức ăn...). Bên cạnh đó cũng có nhiều nghiên cứu đã chỉ ra hiệu quả không rõ rệt của việc bổ sung các chế phẩm probiotic trong chăn nuôi như: (1) Không quan sát thấy ảnh hưởng tích cực của probiotic khi bổ sung trong khẩu phần cho lợn cái và lợn đực thiến ở giai đoạn lợn choai và vỗ béo (Breston và cộng sự, 1998); (2) Đối với lợn con sau cai sữa không nên sử dụng các chế phẩm probiotic (Navas-Sanchez và cộng sự, 1995); (3) Không thấy có sự khác nhau về tỷ lệ tiêu hóa thức ăn và hiệu quả sử dụng năng lượng ở các lô thí nghiệm và đối chứng được ăn thức ăn có và không có bổ sung probiotic (Galassi và cộng sự, 2001),....

Có rất nhiều ý kiến khác nhau khi giải thích sự khác biệt của các kết quả nghiên cứu, nhưng ý

kiến được nhiều nhà khoa học thống nhất là các chế phẩm probiotic tạo nên các đáp ứng tích cực ở gia súc và gia cầm chỉ khi nó có đầy đủ các đặc tính probiotic, sự thiếu một hoặc nhiều các đặc tính của probiotic có thể là nguyên nhân chủ yếu của các đáp ứng âm tính.

Danh mục tài liệu liên quan đến đề tài:

Apajalahti. J.H.A, L.K. Sarkilabti, B.R.E. Maki, J.P. Heikkinen, P.H. Nurminen and W.E. Holben (1998). Effective recovery of bacteria DNA and percent- guanine-plus-cytosin-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Appl Environ. Microbiol*, 64, pp. 4084 - 4088.

Breston. J and Munoz. A (1998). Effects of probiotics in the incidence and treatment of neonatal diarrhea", 15th International Pig Veterinary Society Congress. Nottingham University Press, pp. 24-32.

Dai. D., Nanthkumar. N. N., Newburg. D. S. and Walker. W.A. (2000). Role of oligosaccharides and glycol conjugates in intestinal host defense. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr*, 30, pp. S23-S33.

Fontaine. N., Meslin. J.C., Lory. V and Andrieux. C (1996). Intestinal mucin distribution in the germ-free and in the heteroxenic rather boring a human bacterial flora: Effect of inulin in the diet", *Br. J. Nutr*, 75, pp. 881-892.

Fuller. R (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66, pp. 65-78.

Galassi. G.; Sandrucci. A.; Tamburini. A.; Succi. G. (2001). Energy utilization of a low N-diet added with an antibiotic or with a probiotic in fattening pigs. *Animal physiology – Nutrition, Proceedings of the 15th symposium on energy metabolism in animals, Wageningen*, pp. 145-148.

Gibson. G. R and Fuller. R. (2000). Aspect of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nut*, 130, pp. 391-395.

Glick. B. (1995). The immune system of poultry, *Poultry Production*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 55-62.

Gong. J, Forster. R. J., Yu. H., Chamber. J.R., Sabour. P.M., Wheatcroft. R. and Chen. S. (2002). Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *NCBI*, pp. 280-287

10. Henrich (2006). Acute pancreatitis: ABCs, *Ann Surg*, 243, pp. 154-168.

11. Hershberg. R.M. and L. F. Mayer (2000). Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells – polarity and complexity. *Immunol. Today* 21, pp. 123-28.

12. McCracken. V.J. and Lorenz R.G. (2001). The gastrointestinal ecosystem: Aprecarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell. Microbiol*, 3, pp. 1-11.

13. Navas Sanchez, Yannellys; Quintero Moreno, Armando; Ventura, Max; Casanova, Angel; Paez, Angely Romero, Santos (1995). Use of probiotics in the feeding of pigs in the postweaning phase. *Revista Cientifica*, 5(3), pp. 193-198

14. Netherwood. T, Gilbert. H.J., Parker. D.S. and O'Donnell. A.G. (1999). Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, pp. 5134-5138.

15. Patterson. J.A and Burkholder. K.M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *J. Animal Science*, 82, pp. 627-631.

16. Rolfe. R.D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastro- intestinal health. *J. Nutr*, 130, pp. 396S–402S.
17. Schat. K.A. and Myers. T. J. (1991). Avian Intestinal Immunity. *Crit. Rev. Poult. Biol*, 3, pp. 19–34.
18. Knight. S.C., Ng. S.C., Hart. A.L., Kamm. M.A., Stagg. A. J. (2009). Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. *Inflamm Bowel Dis*, 15(2), pp. 300 – 310.
19. Zhu. S.Y., Zhong. T., Pandya. Y. and Joerger. R. D. (2002). 6S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl. Microbiol*, 68, pp. 124–137.

Trong nước:

Ở nước ta hiện nay, việc nghiên cứu sản xuất probiotic phục vụ cho đời sống dân sinh nói chung và chăn nuôi nói riêng còn rất mới mẻ và bắt đầu được quan tâm trong khoảng một thập kỷ gần đây. Lê Thanh Bình và cộng sự (1999) đã sản xuất chế phẩm PRO99 gồm hai chủng vi khuẩn lactic và nuôi thử nghiệm trên gà Broiler cho thấy quần thể vi sinh vật đường ruột thay đổi theo chiều hướng tích cực, các vi khuẩn lactic tăng, E.coli giảm rõ rệt ở nhóm gà được ăn thức ăn có bổ sung PRO99. Khối lượng cơ thể lúc 50 ngày tuổi của gà ở nhóm được ăn thức ăn có bổ sung PRO99 cao hơn so với đối chứng 10,6%. Phạm Ngọc Lan và cộng sự (2003) đã phân lập được hai trong số 789 chủng vi khuẩn lactic trong ruột gà. Bằng các phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử, nhóm tác giả đã xác định được các chủng CH123 và CH156 có những tính chất probiotic gần với *Lactobacillus agillis* và *Lactobacillus salivarius* (có khả năng đề kháng được với 40% axit mật; sinh trưởng được ở môi trường pH = 4,0 và nồng độ NaCl = 6%, có hoạt tính kháng với *Salmonella*, *E.coli*). Nguyễn Thị Hồng Hà và cộng sự (2003) đã sử dụng hai chủng *Bifidobacterium bifidum* và *Lactobacillus acidophilus* để sản xuất chế phẩm probiotic, bước đầu đã nghiên cứu được công nghệ sản xuất bằng phương pháp sấy phun. Chế phẩm sau 6 tháng vẫn có số tế bào vi khuẩn sống ở mức 10⁶ CFU/g và có khả năng ức chế vi khuẩn *Salmonella*. Nguyễn Thùy Châu (2003) đã lựa chọn được chủng nấm men *Candida utilis* CM25 cho sinh khối cao trên môi trường rỉ mật, bước đầu đã đưa ra quy trình công nghệ sản xuất sinh khối loại nấm men này. Nguyễn La Anh và cộng sự (2003) đã phân lập được chủng vi khuẩn lactic BC5.1 từ nước bắp cải muối chua và đã xác định được rằng chủng vi khuẩn này có tính chất probiotic và có thể sử dụng trong chế biến thực phẩm Biochi dạng dung dịch (từ vi *Bacillus* và *Lactobacillus*) với mật độ 10⁸ CFU/ml có tác dụng cải thiện môi trường nước nuôi tôm, cá. Lê Tấn Hưng, Võ Thị Hồng Hạnh và cộng sự (2003) đã nghiên cứu sản xuất hai chế phẩm probiotic BIOI và BIOII. Chế phẩm BIOII gồm các nhóm vi sinh vật *Lactobacillus*, *Bacillus* và *Sacharomyces* phối hợp với các enzym -amylaza và proteaza dùng trong xử lý môi trường nước nuôi tôm, cá và chế phẩm BIOI dùng trong chăn nuôi. Bạch Quốc Thắng và cộng sự (2010) khảo sát ba chủng lactic (*L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. sporogenes*) cho thấy cả ba nghiên cứu có khả năng sống và sinh trưởng tốt trong điều kiện pH=4 và muối mất ở các nồng độ 0,3 -1%, đây chính là những chủng tiềm năng để chế tạo probiotic sử dụng cho gia súc, gia cầm phòng và điều trị hội chứng tiêu chảy,...

Danh mục tài liệu liên quan đến đề tài:

Nguyễn La Anh, Đinh Mỹ Hằng, Vũ Quỳnh Hương, Nguyễn Hương Giang, Nguyễn Thị Lộc (2003). Đặc điểm chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có ứng dụng trong công nghệ sản xuất nước CVAS. Tuyển tập báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2003, pp. 159-161.

Lê Thanh Bình, Phạm Thị Ngọc Lan, Yoshimi Benno (1999). Tác dụng tăng trưởng đối với gia cầm của chế phẩm vi sinh vật PRO99. Tuyển tập báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 1999, pp. 139-144.

Nguyễn Thị Hồng Hà, Lê Thiên Minh, Nguyễn Thùy Châu (2003). Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic probiotic. Tuyển tập báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2003, pp. 251-255.

Lê Tấn Hưng, Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Trương Thị Hồng Vân, Võ Minh Sơn (2003). Nghiên cứu sản xuất chế phẩm probiotic BIO II và kết quả thử nghiệm trên ao nuôi tôm. Tuyển tập báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2003, pp. 75-79.

Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thanh Bình (2003). Đặc điểm phân loại chủng *Lactobacillus* probiotic CH123 và CH 126 phân lập từ đường ruột của gà. Tuyển tập báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2003, pp. 101-105.

Võ Thị Thứ, Lã Thị Nga, Trương Ba Hùng, Nguyễn Minh Dương, Nguyễn Liêu Ba (2003). Nghiên cứu tạo chế phẩm BIOCHE và đánh giá tác dụng của chế phẩm đến môi trường nước nuôi tôm cá. Tuyển tập báo cáo tại Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2003, pp. 119-122.

Bạch Quốc Thắng, Đỗ Ngọc Thúy, Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Thiện (2010). Khảo sát một số đặc tính của vi khuẩn *Lactobacillus* trong điều kiện in vitro. Khoa học Công nghệ kỹ thuật thú y – tập XVII – số 6.

MỤC TIÊU

Tạo ra chế phẩm probiotic (ở dạng bột) có chất lượng tốt đáp ứng cho nhu cầu thị trường thức ăn chăn nuôi hiện nay và định hướng phát triển bền vững ngành chăn nuôi cho những năm tiếp theo. Từng bước xây dựng ngân hàng các chủng vi sinh vật có lợi để sử dụng tạo chế phẩm probiotic phục vụ cho những nghiên cứu tiếp theo.

NỘI DUNG

15.1. Nội dung nghiên cứu

15.1.1 Phân lập các chủng *Lactobacillus*

- Hình thái khuẩn lạc
- Khả năng sinh catatase
- Khả năng di động
- Nhuộm Gram quan sát hình thái tế bào

15.1.2 Định danh sơ bộ bằng các phản ứng sinh lý sinh hóa

15.1.3 Đánh giá đặc tính probiotic của các chủng *Lactobacillus* phân lập

- Lên men đồng hình/dị hình
- Khả năng chống chịu môi trường axit thấp: pH= 2; pH= 3, pH= 4
- Khả năng chống chịu muối mật: 0,05 – 0,1 – 0,15 – 0,3%
- Khả năng chống chịu phenol: 0,4%
- Kháng vi sinh vật kiểm định *E.coli*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*
- Khả năng sinh trưởng ở các nhiệt độ: 150C, 250C, 370C, 400C
- Khả năng chống chịu NaCl: 1-3-5-7-9%

15.1.4 Định lượng axit lactic được sinh ra

15.1.5 Định danh *Lactobacillus*

- Tách chiết DNA
- Nhân trình tự rDNA 16S
- Tinh sạch sản phẩm PCR

- Đọc trình tự, xác định loài

15.1.6 Xác định động thái lên men, tạo chế phẩm sinh học

15.1.6.1 Khảo sát sơ bộ động thái lên men

- Nhu cầu sử dụng oxy

- Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến sinh trưởng của vi khuẩn

- Ảnh hưởng của tốc độ nuôi lắc đến sinh trưởng của vi khuẩn

15.1.6.2 Khảo sát động thái lên men trên thiết bị lên men Infors

15.1.6.3 Chế tạo chế phẩm (Nguyễn Thế Trang, 2010)

- Thu hồi sinh khối tế bào

- Phối trộn các chất mang

- Kiểm tra số lượng tế bào trong chế phẩm

15.1.7 Đánh giá sơ bộ chế phẩm trên động vật thí nghiệm

* Trong phòng thí nghiệm: Sự biến động về số lượng vi khuẩn lactic trong chế phẩm ở nhiệt độ phòng

* Thử nghiệm chế phẩm trên động vật thí nghiệm (gà):

- Kiểm tra sự ảnh hưởng của chế phẩm tới sinh trưởng của gà

- Tác dụng của chế phẩm đến số lượng E.coli, Salmonella trong đường tiêu hóa của gà

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

14.2.1 Phương pháp thu thập mẫu

Các sản phẩm được thu thập tại địa bàn thành phố Thái Nguyên mang tích chất đại diện, sau khi được thu được mẫu, các mẫu này sẽ được mã hóa và được bảo quản ở 40C.

14.2.2 Phương pháp nuôi cấy, phân lập

* Phân lập:

Để phân lập vi khuẩn lactic từ các sản phẩm lên men sử dụng phương pháp pha loãng mẫu bằng nước vô trùng, cấy gạt dịch pha loãng ở nồng độ thích hợp trên đĩa petri chứa môi trường MRS. Nuôi ở 370C trong 48 giờ. Kiểm tra sự xuất hiện các khuẩn lạc trên đĩa Petri, tách và thuần khiết các khuẩn lạc có vùng trong suốt xung quanh (axit phân giải CaCO₃ tạo vòng trong). Bảo quản giống trong ống nghiệm môi trường MRS thạch nghiêng. Mỗi mẫu phân lập chọn các khuẩn lạc có hình thái khác nhau và quan sát tế bào dưới kính hiển vi (Xiao-Hua Guo và cộng sự 2010)

* Nhuộm Gram:

Dùng que cấy vô trùng lấy dịch huyền phù tế bào vi khuẩn đặt lên phiến kính. Cố định tiêu bản bằng ngọn lửa rồi nhuộm thuốc đầu bằng dung dịch tím kết tinh (crystal violet) trong khoảng 1 phút. Rửa bằng nước. Nhuộm tiếp bằng dung dịch Lugol trong 1 phút. Rửa bằng nước. Phủ lên vết bôi dung dịch etanol 95%:axeton (1:1) trong khoảng 1 phút. Lại rửa bằng nước. Sau đó nhuộm tiếp bằng thuốc nhuộm màu đỏ (như Safranin hay Fuchsin Ziehl) trong 30 giây - Rửa qua nước, để khô, soi kính (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự 1975).

* Phản ứng sinh catalaza:

Nhỏ trực tiếp vài giọt H₂O₂ lên bề mặt của khuẩn lạc và quan sát sự xuất hiện bọt bằng mắt thường.

14.2.3 Định danh sơ bộ các chủng Lactobacillus (Theo khóa phân loại của Bergey, 1984)

14.2.4 Phương pháp đánh giá đặc tính probiotics

* Lên men đồng hình/dị hình

Úp ngược ống Durham vào bên trong ống nghiệm có chứa môi trường MRS ở dạng lỏng, tiến hành nuôi cấy chủng cần tuyển chọn bằng cách quan sát khí trong ống Durham (Nguyễn Lâm

Dũng và cộng sự, 1975).

* Hoạt tính kháng khuẩn:

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp đục lỗ. Phương pháp như sau: môi trường thử hoạt tính kháng khuẩn được đổ trên đĩa petri (chứa vi khuẩn kiểm định), sau khi môi trường đã đông cứng tiến hành đục lỗ thạch. Nhỏ phần dịch trong (dịch nuôi cấy đã li tâm) vào các lỗ đã đục, để ở 40C trong 6 giờ, sau đó mang các đĩa thạch để 370C. Sau 24 giờ quan sát vòng kháng khuẩn tạo thành. Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi sinh vật tuyển chọn được tính bằng đường kính vòng kháng khuẩn ΔD (Schillinger và cộng sự, 1989).

$\Delta D = D - d$ (mm) với D: đường kính vòng vô khuẩn (mm); d: đường kính lỗ thạch (mm)

* Khả năng chống chịu phenol:

Pha chế môi trường MRS ở dạng lỏng có bổ sung 0,4% phenol, sau đó tiến hành nuôi cấy các chủng Lactobacillus theo dõi sự sinh trưởng của chúng từ 0 – 1 – 2 – 3 – 4 – 24 – 48 – 72 giờ thông qua chỉ số OD600 và CFU (Hoque và cộng sự, 2010)

* Khả năng chống chịu muối mật:

Pha chế môi trường MRS ở dạng lỏng có bổ sung 0,05 – 0,1 – 0,15 – 0,3% muối mật, sau đó tiến hành nuôi cấy các chủng Lactobacillus theo dõi sự sinh trưởng của chúng từ 0 – 1 – 2 – 3 – 4 – 24 – 48 – 72 giờ thông qua chỉ số OD600 và CFU (Sahadeva và cộng sự, 2011)

* Khả năng chống chịu NaCl:

Pha chế môi trường MRS ở dạng lỏng có bổ sung 1-3-5-7-9% muối NaCl, sau đó tiến hành nuôi cấy các chủng Lactobacillus theo dõi sự sinh trưởng của chúng từ 0 – 1 – 2 – 3 – 4 – 24 – 48 – 72 giờ thông qua chỉ số OD600 và CFU (Hoque và cộng sự, 2010)

* Khả năng chống chịu axit thấp:

Pha chế dung môi PBS được điều chỉnh ở pH =2; pH =3 bằng HCl 1M, sau đó cấy các chủng Lactobacillus theo dõi sự sinh trưởng của chúng từ 0 – 1 – 2 – 3 giờ thông qua chỉ số CFU (Sahadeva và cộng sự, 2011)

* Khả năng sinh trưởng ở các nhiệt độ khác nhau:

Pha chế môi trường MRS ở dạng lỏng sau đó tiến hành nuôi cấy các chủng Lactobacillus nuôi ở 150C, 250C, 370C và 400C theo dõi sự sinh trưởng của chúng từ 0 – 1 – 2 – 3 – 4 – 24 – 48 – 72 giờ thông qua chỉ số OD600 và CFU (Hatice, 2007)

14.2.5 Phương pháp định lượng axit lactic được sinh ra

Lấy 10ml dịch lên men đã li tâm bỏ sinh khối, bổ sung 20ml nước cất và thêm 2 giọt phenolphthalein (nồng độ 1% trong cồn 90%). Sau đó chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại. Ghi lại thể tích NaOH (ml) đã dùng. Lượng axit lactic được tính như sau:

% axit lactic sinh ra = V_{NaOH} tiêu tốn $\times 0,009$ (g/l)

14.2.6 Phương pháp định danh Lactobacillus (Theo phương pháp của Cardinal và cs, 1997)

- Tách chiết DNA
- Nhân trình tự rDNA 16S
- Tinh sạch sản phẩm PCR
- Đọc trình tự, xác định loài

14.2.7 Phương pháp tạo chế phẩm (Nguyễn Thế Trang, 2010)

14.2.8 Phương pháp đánh giá chế phẩm

* Trong phòng thí nghiệm:

- Sự biến động về số lượng vi khuẩn lactic trong chế phẩm ở nhiệt độ phòng: Định kỳ 1-2-3-4-5-6

tháng lấy mẫu chế phẩm tiến hành phân tích số lượng tế vi khuẩn/gam (Bạch Quốc Thắng và cộng sự, 2010).

* Thử nghiệm chế phẩm trên động vật thí nghiệm (gà):

Nghiên cứu này được bố trí thành 3 lô thí nghiệm: TN1 Có bổ sung chế phẩm chế tạo ra 2% so với tổng lượng thức ăn; Đ/C không bổ sung chế phẩm; TN2 Bổ sung chế phẩm (2% so với tổng lượng thức ăn) cùng loại hiện có trên thị trường (Phạm Thị Ngọc Lan, 2007):

- Kiểm tra sự ảnh hưởng của chế phẩm tới sinh trưởng của gà: Tiến hành cân gà thí nghiệm vào buổi sáng trước khi cho ăn các giai đoạn: Sơ sinh – 10 – 20 – 30 – 40 – 50 – 60 ngày tuổi.

- Tác dụng của chế phẩm đến số lượng E.coli, Salmonella trong đường tiêu hóa của gà: Các mẫu phân gà được lấy ngay sau khi bài tiết ra và đưa vào ống nghiệm vô trùng được bảo quản lạnh rồi tiến hành phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật ngay. Cân 10 gam phân gà được hòa tan đều trong 90ml nước muối sinh lý vô trùng, pha loãng đến nồng độ thích hợp, nuôi cấy ở môi trường chọn lọc. Từ các khuẩn lạc phát triển trên môi trường đặc trưng từ đó định lượng số lượng E.coli (TCVN 4882-2007), Salmonella (TCVN 4892-2005) có ở trong phân gà ở các giai đoạn: sơ sinh – 10 – 20 – 30 – 40 – 50 – 60 ngày tuổi.

14.2.9 Phương pháp đếm tế bào vi khuẩn lactic (52 TCN - TQTP 0013: 2006)

Để xác định tổng số vi khuẩn Lactic có trong 1g (1ml) mẫu kiểm nghiệm, chọn những đĩa có không quá 150 khuẩn lạc của 2 đậm độ pha loãng liên tiếp. Tổng số vi khuẩn Lactic có trong 1g hoặc 1ml mẫu thử (N) được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{aC}{V(n1 + 0,1xn2)d}$$

Trong đó:

a C: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa đã chọn.

V: Thể tích cấy trên mỗi đĩa tính bằng ml

n1: Số đĩa của đậm độ pha loãng thứ nhất được giữ lại

n2: Số đĩa của đậm độ pha loãng thứ hai được giữ lại

d: Hệ số pha loãng của đậm độ pha loãng thứ nhất

14.2.10 Phương pháp xử lý số liệu: Excel, STATG

HIỆU QUẢ KTXH

Miền núi phía Bắc là một địa bàn trọng yếu về an ninh quốc phòng của cả nước, việc đảm bảo an ninh trên cơ sở phát triển kinh tế xã hội, tạo công ăn việc làm, nâng cao thu nhập cho người dân trên địa bàn, nhanh chóng đưa các tỉnh miền núi tiến kịp miền xuôi chính là vấn đề luôn giành được sự quan tâm hành đầu của Đảng và Nhà nước ta.

Thái Nguyên là cửa ngõ giao lưu kinh tế - xã hội giữa vùng trung du miền núi với vùng đồng bằng Bắc Bộ. Hơn nữa, trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên tập trung rất nhiều các trường Đại học, đứng thứ 3 trong cả nước về quy mô đào tạo. Hàng năm thu hút và đào tạo hàng chục ngàn sinh viên ra trường phục vụ phát triển kinh tế của vùng trung du miền núi phía Bắc nói riêng và cả nước nói chung. Việc triển khai đề tài nghiên cứu sẽ góp phần đào tạo các đội ngũ trí trẻ gắn lý thuyết với thực nghiệm. Nghiên cứu cũng tạo ra sản phẩm ứng dụng trong đời sống sản xuất của nhân dân, phát triển ngành chăn nuôi theo hướng bền vững.

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG

- Các cơ sở/trang trại/hộ gia đình chăn nuôi.

- Các Công ty sản xuất và kinh doanh thức ăn gia súc, gia cầm

- Các cơ sở đào tạo, nghiên cứu trong và ngoài tỉnh.