

**SẢN XUẤT VÀ THỬ NGHIỆM HIỆU QUẢ CHẾ PHẨM PROBIOTIC
LÊN TỶ LỆ SỐNG, HỆ SỐ TIÊU TỐN THỨC ĂN VÀ TĂNG TRỌNG
CỦA CÁ CHÉP NHẬT (*Cyprinus carpio*)**
**PRODUCTION AND TESTING PROBIOTIC EFFECT ON SURVIVAL
RATE, COEFFICIENT OF CONSUMING FOOD AND GROWTH OF *Cyprinus carpio***

Võ Ngọc Thanh Tâm¹, Trương Phước Thiên Hoàng², Ngô Văn Ngọc³

¹*Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm Tp.HCM*

²*Viện NC Công Nghệ Sinh Học & Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm Tp.HCM*

³*Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm Tp.HCM*

ABSTRACT

Using probiotic helped aquaculture increase a quantity of microorganism, enhance a nutritional content and improve an immune ability of springs to prevent microorganic pathogen. Moreover, probiotic also minimized the using of antibiotic and chemical which preventing diseases, reduce to a minimum polluted environment matter and bad impact on human health. Probiotic was the mixture of *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. Using Heinkel method to define amylase activity, Anson method to define protease activity, Fiske and Subbarow method for phytase activity defining and defining cellulase activity by quantifying glucose according to Miller to examine probiotic preserved time. Probiotic was verified antibacterial ability by piercing a hole agar, studied on ratio of mixture of probiotic and aquaculture food and evaluated the suitable ratio rely on digestive ability of ornament fish. Manufacture probiotic on pilot scale can resist *E. coli*, *Samonella* and stimulate strongly to food digestion of ornament fish when it was mixed to aquaculture food with 5% ratio.

TÓM TẮT

Sử dụng probiotic giúp tăng số lượng vi sinh vật thực phẩm cho thủy sản, nâng cao hàm lượng dinh dưỡng và cải thiện khả năng miễn dịch của con giống để ngăn chặn mầm bệnh vi sinh. Hơn thế nữa, probiotic còn có thể giúp giảm thiểu việc sử dụng các thuốc kháng sinh và hóa chất để ngăn ngừa dịch bệnh, hạn chế tối đa vấn đề ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người. Chế phẩm probiotic là kết quả của sự phối trộn ba chủng vi khuẩn nuôi cấy *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* và *Saccharomyces cerevisiae*. Sử dụng phương pháp Heinkel xác định hoạt tính amylase, phương pháp Anson xác định hoạt tính protease, phương pháp Fiske và Subbarow xác định hoạt tính phytase, phương pháp định lượng đường theo Miller xác định hoạt tính cellulase để khảo sát thời gian bảo quản chế phẩm. Chế phẩm được kiểm tra tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch, khảo sát tỷ lệ phối trộn chế phẩm probiotic vào thức ăn viên và đánh giá dựa vào khả năng kích thích tiêu hóa thức ăn cho cá cảnh. Sản xuất được chế phẩm ở quy mô bán sản xuất có khả năng kháng với *E. coli*, *Samonella*, và có tác dụng kích thích tốt khả năng tiêu hóa thức ăn cho các cảnh ở tỷ lệ phối trộn thích hợp vào thức ăn viên là 5%.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ô nhiễm nước nuôi trồng thủy sản ven biển là mối quan tâm hàng đầu của các nhà khoa học. Môi trường ô nhiễm nghiêm trọng thường dẫn đến bệnh dịch, để ngăn ngừa và kiểm soát dịch bệnh, người ta đã sử dụng thuốc kháng sinh, thuốc trừ sâu và các hóa chất,

điều này đã tạo ra gây ra nhiều thiệt hại cho nuôi trồng thủy sản, mối nguy hiểm đe dọa sức khỏe con người. Bên cạnh đó, vấn đề về tăng hàm lượng dinh dưỡng và khả năng kháng bệnh cho thủy sản cũng mang lại những lợi ích kinh tế to lớn và bền vững.

Câu hỏi đặt ra là “Làm thế nào để vừa mang lại nguồn dinh dưỡng dồi dào, khả năng kháng bệnh lâu dài cho cá vừa giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh, hóa chất, cải thiện môi trường sinh thái giúp mang lại lợi ích tối đa cho nghề nuôi trồng thủy sản và bảo vệ lợi ích cho người sử dụng?” Vấn đề trên là mối quan tâm của nhiều nhà khoa học, biện pháp tối ưu cho vấn đề này là khuyến cáo việc sử dụng probiotics trong nuôi trồng thủy sản. Bởi việc sử dụng probiotics giúp tăng số lượng vi sinh vật thực phẩm cho thủy sản, nâng cao hàm lượng dinh dưỡng và cải thiện khả năng miễn dịch của con giống để ngăn chặn mầm bệnh vi sinh. Hơn thế nữa, probiotics còn có thể giúp giảm thiểu việc sử dụng các thuốc kháng sinh và hóa chất để ngăn ngừa dịch bệnh, hạn chế tối đa vấn đề ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* được cung cấp bởi Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, *Lactobacillus acidophillus* và nấm men *Saccharomyces Cerevisiae* được cấp bởi công ty TNHH Gia Tường- khu công nghiệp Sóng Thần.

Escherichia coli, *Salmonella* được cung cấp bởi Khoa Chăn nuôi Thú y- Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.

Cá chép Nhật được nuôi dưỡng bởi trại Thực nghiệm Thủy sản trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh. Sau đó tuyển chọn những con khỏe mạnh với kích thước trung bình từ 2 - 4cm để tiến hành bố trí thí nghiệm.

Nguyên liệu và phương pháp

Thức ăn khảo nghiệm: Chúng tôi sử dụng loại thức ăn dành cho cá cảnh kích cỡ 1mm, mua của công ty GROBEST với thành phần dinh dưỡng như sau: Đạm 30%, xơ : 7%, béo : 5%, tro: 12%, độ ẩm: 11%

Các phương pháp sử dụng trong bài nguyên cứu: phương pháp Heinkel, phương pháp Anson, phương pháp Fiske và Subbarow, phương pháp định lượng glucose theo Miller, phương pháp đếm khuẩn lạc, phương pháp xác định hàm lượng acid lactic, phương pháp đục lỗ thạch kiểm tra tính kháng khuẩn, các kỹ thuật nuôi cá chép Nhật.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả so sánh tỷ lệ về hoạt độ các enzyme amylase, protease, phytase, cellulase và mật số tế bào trong chế phẩm *Bacillus subtilis* nuôi cấy ở quy mô phòng thí nghiệm và bán sản xuất.

Bảng 1. Hoạt tính các enzyme và mật độ tế bào ở cả quy mô phòng thí nghiệm và quy mô bán sản xuất (pilot)

Chi tiêu xác định	Nuôi cấy quy mô phòng thí nghiệm		Nuôi cấy quy mô bán sản xuất (pilot)	
	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$
Amylase (UI/gCP)	3	2512,65 $\pm$ 25.66	3	1971,86 $\pm$ 39,71
Protease (UI/gCP)	3	32,62 $\pm$ 0,47	3	23,55 $\pm$ 0,36
Phytase (UI/gCP)	3	5260,32 $\pm$ 156,99	3	3431,89 $\pm$ 12,72
Cellulase(UI/gCP)	3	6221,55 $\pm$ 176,52	3	5016,19 $\pm$ 73,83
Mật độ tế bào (CFU/gCP)	3	2,94x10 ⁹ $\pm$ 2,8x10 ⁷	3	2,73x10 ⁹ $\pm$ 1,39x10 ⁷

($\bar{X} \pm SE$: trung bình hoạt tính các enzyme $\pm$ sai số chuẩn)

Kết quả ghi nhận được trình bày ở bảng 1, nhận thấy hoạt tính các enzyme amylase, protease, phytase, cellulase và mật độ tế bào trong chế phẩm được sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm cao hơn rất nhiều so với quy mô pilot. Cụ thể, kết quả xử lý thống kê cho thấy có sự khác biệt rất có ý nghĩa giữa hoạt tính các enzyme và mật độ tế bào trong chế phẩm sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô bán sản xuất.

2. Kết quả nuôi cấy thu nhận chế phẩm *Lactobacillus acidophilus*.

Bảng 2. Hàm lượng acid lactic và mật độ tế bào *Lactobacillus acidophilus*

Chi tiêu xác định	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$
Acid lactic (g/L)	3	42,18 $\pm$ 0,53
Mật độ tế bào (CFU/gCP)	3	2,04x10 ⁹ $\pm$ 5,4x10 ⁸

($\bar{X} \pm SE$: trung bình $\pm$ sai số chuẩn)

Từ kết quả ở bảng 2, nhận thấy kết quả về hàm lượng acid lactic tương đối cao hơn kết quả thu nhận chế phẩm *Lactobacillus acidophilus* của các tác giả khác. Cụ thể hàm lượng acid lactic thu nhận được là 42,18 g/L so với kết quả thu được của Huỳnh Minh Thư, 2008 là 19,8g/L.

3. Kết quả nuôi cấy thu nhận chế phẩm *Saccharomyces cerevisiae*

Bảng 3. Mật độ tế bào *Saccharomyces cerevisiae*

Chi tiêu xác định	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$
Mật độ tế bào (CFU/gCT)	3	2,05x10 ⁹ $\pm$ 3,64x10 ⁷

($\bar{X} \pm SE$: trung bình $\pm$ sai số chuẩn)

Trong tế bào nấm men có nhiều loại vitamin và với hàm lượng khá lớn, do đó chúng tôi tiến hành nuôi cấy thu nhận sinh khối nấm men *Saccharomyces cerevisiae* nhằm cung cấp thêm vitamin và khoáng chất cho probiotic bổ sung vào thức ăn cho cá.

4. Kết quả phối trộn ba canh trường nuôi cấy *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* và *Saccharomyces cerevisiae*.

Bảng 4. Các chỉ tiêu trong chế phẩm hỗn hợp

Chỉ tiêu xác định	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$
Amylase (UI/gCP)	3	1563.56 $\pm$ 89.63
Phytase (UI/gCP)	3	3076.64 $\pm$ 126.92
Cellulase (UI/gCP)	3	4081,13 $\pm$ 37,65
Mật độ tế bào <i>Bacillus subtilis</i> (CFU/gCP)	3	1,201x10 ⁹ $\pm$ 5x10 ⁷
Mật độ tế bào <i>Lactobacillus acidophilus</i> (CFU/gCP)	3	1,11x10 ⁷ $\pm$ 1,12x10 ⁶
Acid lactic	3	44,02 $\pm$ 0,85
Mật độ tế bào <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CFU/gCP)	3	2,57 x10 ⁹ $\pm$ 6,45x10 ⁷
Protease (UI/gCP)	3	23,55 $\pm$ 0,36
Protein tổng (%)	3	10

($\bar{X} \pm SE$: trung bình $\pm$ sai số chuẩn)

Qua bảng 4 cho thấy, kết quả sau khi phối trộn thành chế phẩm probiotic và sau khi phối trộn không có sự khác biệt nhiều về mật độ tế bào, nhưng lại có sự sụt giảm hoạt độ enzyme, cụ thể 1563,56 UI/gCT so với 1971,86 UI/gCT đối với amylase, 11,08 UI/gCT so với 23,55 UI/gCT đối với protease, 3076,64 UI/gCT so với 3431,89 UI/gCT đối với phytase và 4081,13 UI/gCT so với 5016,19 UI/gCT đối với cellulase. Và hàm lượng acid lactic tăng lên 44,02g/L so với 42,18g/L. Trong khi đó, hàm lượng acid lactic tăng là do trong thành phần của chất mang (bột đậu nành) cũng chứa một lượng nhỏ acid lactic (được xác định trong mẫu thử không khi đo hàm lượng acid lactic), mà chế phẩm *Bacillus subtilis* và chế phẩm *Saccharomyces cerevisiae* đều có chứa rất nhiều bột đậu nành. Vì vậy chế phẩm hỗn hợp probiotic có hàm lượng acid lactic cao hơn chế phẩm *Lactobacillus acidophilus*.

5. Kết quả kiểm tra khả năng kháng khuẩn của chế phẩm

Bảng 5. Đường kính vòng kháng khuẩn của chế phẩm thử nghiệm

Chế phẩm	Vi khuẩn	Lặp lại	$\bar{X} \pm SE$ (cm)
Chế phẩm thử nghiệm	<i>E. coli</i>	3	0,27 $\pm$ 0,03
	<i>Samonella</i>	3	0,25 $\pm$ 0,05

($\bar{X} \pm SE$: trung bình $\pm$ sai số chuẩn)

Qua bảng 5 nhận thấy chế phẩm probiotic thử nghiệm có tính kháng với vi khuẩn *E.coli* và *Samonella*, tuy nhiên tính kháng thể hiện yếu và không ổn định.

Chế phẩm có tính kháng yếu, do vậy chỉ nên sử dụng chế phẩm probiotic để phòng ngừa và nên sử dụng liên tục trong thời gian dài khi nghi ngờ có dịch xuất hiện.

6. Kết quả khảo sát thời gian bảo quản chế phẩm

Chế phẩm dự kiến được bán ra thị trường, vì thế chúng tôi tiến hành khảo sát thời gian bảo quản chế phẩm với nhiệt độ bảo quản là nhiệt độ phòng, xác định các chỉ tiêu cơ trong chế phẩm (hoạt tính các enzyme, và mật số tế bào, và hàm lượng acid lactic) 10 ngày/ lần và được kết quả như sau:

6.1. Đối với amylase

Bảng 6. Biến thiên hoạt tính amylase qua thời gian bảo quản chế phẩm

Thời gian khảo sát (ngày)	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$ (UI/gCP)	Hao hụt (%)
10	3	2082,01 $\pm$ 22,72 ^a	0,00
20	3	2072,87 $\pm$ 9,49 ^a	0,44
30	3	2051,65 $\pm$ 7,00 ^a	1,46
40	3	1997,99 $\pm$ 0,01 ^b	4,03
50	3	1997,57 $\pm$ 0,08 ^b	4,05
60	3	1951,17 $\pm$ 8,66 ^b	6,28

($\bar{X} \pm SE$: trung bình hoạt độ enzyme $\pm$ sai số chuẩn; các giá trị theo sau các chữ cái (^{a,b}...) khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê).

Hoạt độ enzyme giảm dần vòng 60 ngày, tức là giảm 6,28% so với hoạt tính ban đầu. Như vậy sự sụt giảm nhẹ qua thời gian là do amylase của *Bacillus subtilis* là một metalloenzyme có trung tâm hoạt động chứa ion Ca²⁺, chính Ca²⁺ giúp cho amylase bền trước tác dụng của protease (Nguyễn Đức Lượng, 2004) và làm cho sự sụt giảm này trở nên chậm hơn. Qua xử lý thống kê cho thấy, sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời gian bảo quản 10, 20, 30 ngày so với 40, 50, 60 ngày với mức ý nghĩa P < 0,001.

6.2. Đối với protease

Hoạt độ enzyme giảm mạnh theo thời gian, cụ thể giảm từ 31,09 UI/gCP xuống 14,68 UI/gCP trong vòng 60 ngày, tức là giảm hơn 50% so với hoạt tính ban đầu. Sự sụt giảm mạnh có thể là do enzyme protease dễ bị biến tính hơn các enzyme khác, trong thời gian bảo quản dài, protease bị mất dần hoạt tính.

Như vậy thời gian bảo quản protease là ngắn hơn so với amylase. Kết quả xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời gian bảo quản 10 ngày với 30 ngày, 40 ngày, 50 ngày, 60 ngày với P < 0,001 nhưng không có sự khác biệt giữa 10 ngày với 20 ngày.

Bảng 7. Biến thiên hoạt tính protease qua thời gian bảo quản chế phẩm

Thời gian khảo sát (ngày)	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$ (UI/gCP)	Hao hụt (%)
10	3	$31,09 \pm 3,30^a$	0,00
20	3	$25,11 \pm 0,83^{ab}$	19,23
30	3	$21,04 \pm 0,76^b$	32,33
40	3	$16,45 \pm 0,57^c$	47,09
50	3	$15,91 \pm 0,11^c$	48,83
60	3	$14,68 \pm 0,66^c$	52,78

($\bar{X} \pm SE$: trung bình hoạt độ enzyme $\pm$ sai số chuẩn; các giá trị theo sau các chữ cái (^{a,b...}) khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê).

6.3. Đối với phytase

Bảng 8. Biến thiên hoạt tính phytase qua thời gian bảo quản chế phẩm

Thời gian khảo sát (ngày)	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$ (UI/gCP)	Hao hụt (%)
10	3	$4383,33 \pm 34,37^a$	0
20	3	$4141,27 \pm 43,65^b$	5,52
30	3	$4073,81 \pm 51,89^b$	7,07
40	3	$4034,13 \pm 90,75^b$	7,96
50	3	$3848,41 \pm 24,22^c$	12,20
60	3	$3700,00 \pm 34,69^c$	15,59

($\bar{X} \pm SE$: trung bình hoạt độ enzyme $\pm$ sai số chuẩn; các giá trị theo sau các chữ cái (^{a,b...}) khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê).

Hoạt độ enzyme phytase giảm từ 4383,33 UI/gCP xuống 3700 UI/gCP trong vòng 60 ngày, tức giảm 15,6% so với hoạt độ ban đầu. Kết quả xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời gian bảo quản là 10 ngày so với các thời gian còn lại với $P < 0,001$.

6.4. Đối với cellulase

Bảng 9. Biến thiên hoạt tính cellulase qua thời gian bảo quản chế phẩm

Thời gian khảo sát (ngày)	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$ (UI/gCP)	Hao hụt (%)
10	3	$5721,95 \pm 34,08^a$	0
20	3	$5455,34 \pm 38,99^b$	4,66
30	3	$5342,51 \pm 46,57^b$	6,75
40	3	$5222,54 \pm 42,47^c$	8,73
50	3	$4867,46 \pm 24,88^d$	14,93
60	3	$4829,07 \pm 41,84^d$	15,60

($\bar{X} \pm SE$: trung bình hoạt độ enzyme $\pm$ sai số chuẩn; các giá trị theo sau các chữ cái (^{a,b...}) khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê).

Hoạt tính cellulase giảm từ 5721,95 UI/gCP xuống 4821,07 UI/gCP trong vòng 60 ngày, tức giảm 15,6% so với hoạt độ ban đầu. Kết quả xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời gian bảo quản là 10 ngày so với các thời gian còn lại với $P < 0,001$

Sự sụt giảm hoạt độ enzyme có thể do nhiều yếu tố gây nên, ở đây chúng tôi khảo sát yếu tố thời gian. Thời gian bảo quản chế phẩm càng lâu thì hoạt tính enzyme càng giảm, nhưng sự giảm diễn ra chậm dần. Tuy nhiên, nhìn chung sự sụt giảm so với hoạt tính ban đầu là không đáng kể, chế phẩm sau thời gian bảo quản có chất lượng khoảng 90% so với chế phẩm ban đầu, điều này cũng không làm giảm đi giá trị kinh tế của chế phẩm.

6.5. Đối với mật độ tế bào *Bacillus subtilis*

Bảng 10. Biến thiên mật độ tế bào *Bacillus subtilis* qua thời gian bảo quản chế phẩm

Thời gian khảo sát (ngày)	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$ (CFU/gCP)
10	3	$2,92 \times 10^9 \pm 1,09 \times 10^{7a}$
20	3	$2,89 \times 10^9 \pm 1,21 \times 10^{7ab}$
30	3	$2,86 \times 10^9 \pm 2,69 \times 10^{7b}$
40	3	$2,80 \times 10^9 \pm 1,69 \times 10^{7c}$
50	3	$2,78 \times 10^9 \pm 1,09 \times 10^{7cd}$
60	3	$2,73 \times 10^9 \pm 1,39 \times 10^{7d}$

($\bar{X} \pm SE$: trung bình mật độ tế bào $\pm$ sai số chuẩn; các giá trị theo sau các chữ cái (^{a,b...}) khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê).

Mật độ tế bào giảm dần theo thời gian bảo quản. Số lượng tế bào *Bacillus subtilis* giảm 0,317% so với mật độ ban đầu, sự sụt giảm này là không đáng kể. Tuy nhiên, theo kết quả xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời gian bảo quản 10 ngày so với các thời gian bảo quản còn lại ở mức $P < 0,001$.

6.6. Đối với mật độ tế bào *Lactobacillus acidophilus*

Bảng 11. Biến thiên mật độ tế bào *Lactobacillus acidophilus*

Thời gian khảo sát (ngày)	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$ (CFU/gCP)
10	3	$2,04 \times 10^9 \pm 5,4 \times 10^{8a}$
20	3	$1,93 \times 10^7 \pm 4,8 \times 10^{6b}$
30	3	$8,42 \times 10^5 \pm 1,14 \times 10^{5b}$
40	3	$2,21 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^{4b}$
50	3	$3,21 \times 10^4 \pm 6,74 \times 10^{3b}$
60	3	$3,5 \times 10^4 \pm 1,19 \times 10^{4b}$

($\bar{X} \pm SE$: trung bình mật độ tế bào $\pm$ sai số chuẩn; các giá trị theo sau các chữ cái (^{a,b...}) khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê)

Số lượng tế bào *Lactobacillus acidophilus* giảm 55% so với mật độ ban đầu. Theo kết quả xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời gian bảo quản 10 ngày so với các thời gian bảo quản còn lại ở mức $P < 0,001$.

6.7. Đối với hàm lượng acid lactic

Hàm lượng acid lactic giảm 26,32 % so với hàm lượng ban đầu, và sự sụt giảm này là bình thường. Theo kết quả xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời gian bảo quản 10 ngày so với các thời gian bảo quản còn lại ở mức $P < 0,001$.

Bảng 12. Biến thiên hàm lượng acid lactic qua thời gian bảo quản chế phẩm

Thời gian khảo sát (ngày)	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$ (g/L)
10	3	$42,18 \pm 0,53^a$
20	3	$37,07 \pm 0,75^b$
30	3	$35,11 \pm 0,29^c$
40	3	$33,53 \pm 0,52^{cd}$
50	3	$31,87 \pm 0,59^d$
60	3	$31,80 \pm 0,90^d$

($\bar{X} \pm SE$: trung bình mật độ tế bào $\pm$ sai số chuẩn; các giá trị theo sau các chữ cái ($^{a,b,\dots}$) khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê).

6.8. Kết quả khảo sát mật độ tế bào *Saccharomyces cerevisiae*.

Bảng 13. Biến thiên mật độ tế bào *Sacchromyces cerevisiae*

Thời gian khảo sát (ngày)	Lặp lại (n)	$\bar{X} \pm SE$ (CFU/gCP)
10	3	$2,05 \times 10^9 \pm 3,64 \times 10^{7a}$
20	3	$1,88 \times 10^9 \pm 3,72 \times 10^{7b}$
30	3	$1,83 \times 10^9 \pm 5,66 \times 10^{7b}$
40	3	$1,71 \times 10^9 \pm 3,57 \times 10^{7c}$
50	3	$1,12 \times 10^8 \pm 3,49 \times 10^{6d}$
60	3	$1,06 \times 10^8 \pm 4,59 \times 10^{6d}$

($\bar{X} \pm SE$: trung bình mật độ tế bào $\pm$ sai số chuẩn; các giá trị theo sau các chữ cái ($^{a,b,\dots}$) khác nhau thì sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê).

Mật độ tế bào giảm dần theo thời gian bảo quản. Số lượng tế bào *Saccharomyces cerevisiae* giảm 13,85% so với mật độ ban đầu. Theo kết quả xử lý thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa thời gian bảo quản 10 ngày so với các thời gian bảo quản còn lại ở mức $P < 0,001$.

7. Đánh giá hiệu quả kinh tế

Chế phẩm probiotic lấy tên thương mại là LACBASAC, do Viện Công nghệ Sinh Học và Môi trường, Đại học Nông Lâm TP HCM đứng tên thương mại sản phẩm.

Bảng 14. Giá chi tiết thành phần sản phẩm probiotic

Môi trường MRS			Giá gốc (VNĐ)	Môi trường Hansen		Giá gốc (VNĐ)
Pepton	10 g		5200	Glucose	50 g	750
Cao thịt	8 g		14528	Pepton	10 g	5200
Cao men	4 g		15464	KH ₂ PO ₄	2 g	360
Glucose	20 g		300	MgSO ₄	1 g	200
K ₂ HPO ₄	2 g		360	Agar	20 g	1200
Tween 80	1 mL		1000	Cám	4 kg	21000
CH ₃ COONa	5g		600	Nước	1 lit	50
(NH ₄) ₄ CO ₃	2 g		360	Tổng (4 kg)		28760
MgSO ₄	0,2 g		500	Môi trường nuôi cấy <i>Bacillus subtilis</i>		Giá gốc (VNĐ)
MNSO ₄	0,05 g		36	Giá	200 g	2000
Nước	1L		50	Pepton	10 g	5200
Agar	20 g		1200	Glucose	50 g	300
Bột đậu nành	4 kg		40000	Nước	1 lit	50
				Canh trường	4 kg	32000
Tổng (4 kg)			79598	Tổng (4 kg)		39550

Bảng 15. So sánh giá thành sản phẩm giữa các công ty

Tên sản phẩm	Nơi sản xuất	Chỉ tiêu chất lượng (CFU/gCP)			Giá thành (VNĐ)/kg
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
LACBASAC	Viện NC CNSH và MT – ĐHNH.TPHCM	> 10 ⁹	> 10 ⁷	> 2x10 ⁹	50000
Bioprobiotic	Công ty CN Hóa Sinh Việt Nam – TPHCM	> 3x10 ⁸	> 3x10 ⁸	> 3x10 ⁸	100000
Bio- fish MV	Công ty TNHH Sinh học Mai Việt – TPHCM	> 2x10 ⁸	-	-	80000
Biolac	Công ty TNHH thuốc thú y Á Châu – Cần Thơ	> 10 ⁹	> 10 ⁸	> 10 ⁹	120000
Gestylic	Công ty sản xuất thương mại A.S.T.A – TPHCM	> 3x10 ⁸	> 10 ⁷	> 10 ⁹	90000

Sản phẩm thử nghiệm probiotic cho chất lượng cao, giá thành rẻ, có khả năng thương mại tốt. So với các sản phẩm của các công ty lớn thì LACBASAC rẻ hơn rất nhiều. Tuy nhiên, sản phẩm được sản xuất thủ công, quy mô hộ gia đình nên chỉ tính giá trị thực của sản phẩm, chứ chưa thực sự là bài toán kinh tế. Vì để một sản phẩm tới tay người tiêu dùng phải tốn nhiều chi phí khác như: quảng cáo, tiếp thị, vận chuyển và một số chi phí khác không được tính ở đây như chi phí hao mòn thiết bị, mặt bằng mua bán, thuê nhân công. Tất cả các

chi phí trên phải được cộng vào sản phẩm, từ đó mới có thể tính được bài toán kinh tế thực sự. Đó cũng là lý do mặc dù nguyên liệu sản xuất rất rẻ tiền nhưng các công ty đưa ra giá sản phẩm rất cao. Sản phẩm LACBASAC nếu được đầu tư đúng mức trong khâu sản xuất và thương mại sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cho người sản xuất là không nhỏ.

8. Khảo sát tỷ lệ phối trộn thích hợp chế phẩm probiotic với thức ăn có sẵn dành cho cá cảnh.

8.1 Một số yếu tố môi trường trong thí nghiệm

Nhiệt độ (Đỗ Thị Hòa và ctv, 2006).

Trong quá trình thí nghiệm, nhiệt độ đo được dao động từ 27,4 – 28,2. Đây là khoảng nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của cá. Nhìn chung, nhiệt độ nằm trong khoảng cho phép, tương đối đồng đều giữa các nghiệm thức và không ảnh hưởng lắm đến kết quả thí nghiệm.

Hàm lượng oxy hòa tan (DO) (Nguyễn Phú Hòa, 2000).

Theo các số liệu theo dõi cho thấy hàm lượng oxy hòa tan giữa các bể chênh lệch không đáng kể. DO có sự biến động giữa sáng và chiều do hoạt động quang hợp, hô hấp của tảo và cá. Biến động DO vào buổi sáng giữa các ngày từ 10,5 mg/L, buổi chiều 8,2 mg/L. Nhưng nhìn chung DO vẫn nằm trong khoảng cho phép và tương đối đồng đều giữa các nghiệm thức trong suốt quá trình thí nghiệm và không ảnh hưởng nhiều đến kết quả thí nghiệm.

Độ pH của nước (Đỗ Thị Hòa và ctv, 2006).

Nhìn chung pH trong suốt quá trình thí nghiệm, giữa sáng và chiều là (7,2 – 8,8) đều nằm trong khoảng cho phép của cá, không ảnh hưởng đến tăng trưởng và khả năng bắt mồi của cá. pH giữa các lần lặp lại không sai khác nhau.

Ammonia (Nguyễn Phú Hòa, 2000).

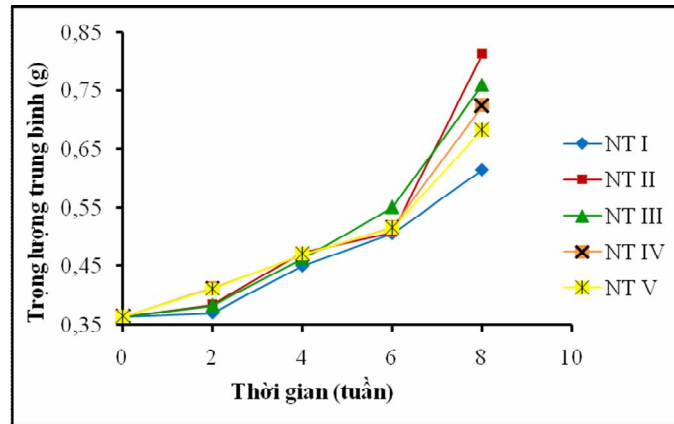
Từ các kết quả theo dõi cho thấy nồng độ NH_3 vẫn luôn nằm trong khoảng cho phép (0,01 – 0,06 mg/l) tăng dần theo thời gian thí nghiệm và không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Đây là khoảng ammonia hầu như không làm ảnh hưởng đến sự phát triển của cá.

8.2 Kết quả thí nghiệm

Chỉ tiêu về tăng trưởng của cá thí nghiệm

- **Trọng lượng trung bình**

Qua đồ thị 1, nhận thấy trong 4 tuần đầu tiên cá ở các bể tăng trưởng gần như bằng nhau, nhưng đến tuần thứ 6 thì sự phát triển của cá ở các nghiệm thức đã bắt đầu có sự khác biệt. Từ tuần thứ 6 đến tuần thứ 8 thì tốc độ tăng trưởng về trọng lượng ở các nghiệm thức đã trở nên phân biệt và rõ ràng hơn.

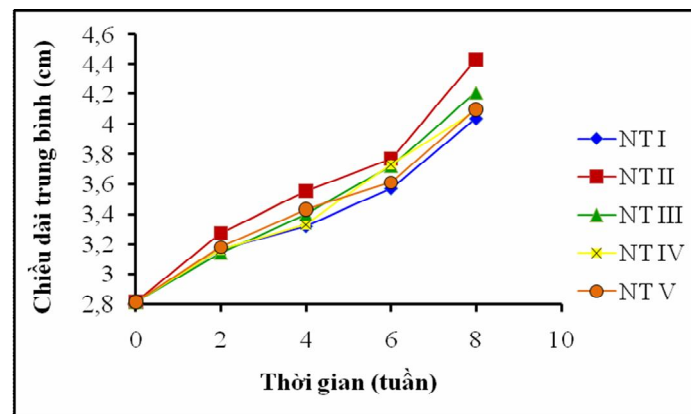


Đồ thị 1. Biến thiên trọng lượng trung bình giữa các NT.

Trọng lượng trung bình của cá trước khi thí nghiệm là 0,364 và đồng đều giữa các nghiệm thức (sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê). Sau 8 tuần thí nghiệm trọng lượng của cá tăng từ 0,364 đến 0,813. Trong điều kiện dinh dưỡng đầy đủ, môi trường nuôi ổn định và được giữ đồng đều, trọng lượng thu được cho thấy ở nghiệm thức II cho tăng trọng cao nhất và thấp nhất là nghiệm thức I. Tuy nhiên, theo kết quả phân tích thống kê thì lại sai khác không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ($P > 0,05$).

- **Chiều dài trung bình**

Trong 4 tuần đầu tiên thì cá ở các bể tăng trưởng về chiều dài gần như bằng nhau nhưng đến tuần thứ 6 thì sự phát triển của cá ở các nghiệm thức đã bắt đầu có sự khác biệt. Từ tuần thứ 6 đến tuần thứ 8 thì tốc độ tăng trưởng về chiều dài ở các nghiệm thức đã trở nên rõ ràng hơn.



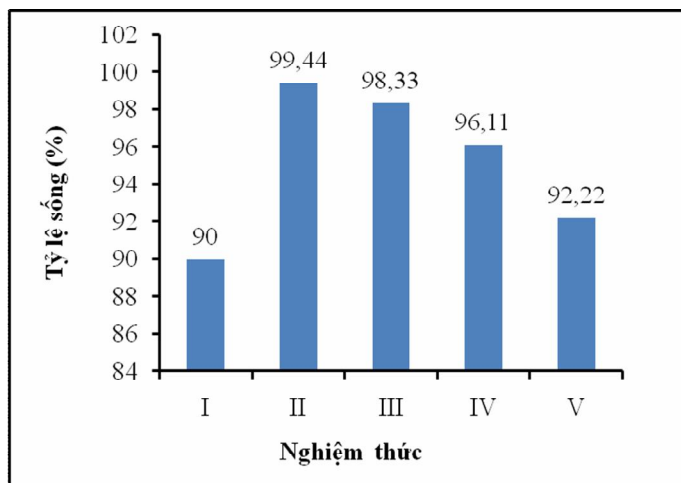
Đồ thị 2. Biến thiên chiều dài trung bình giữa các NT.

Chiều dài trung bình của cá trước khi thí nghiệm là 2,81 và đồng đều giữa các nghiệm thức (sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê). Sau 8 tuần thí nghiệm chiều dài của cá tăng từ 2,81 đến 4,43. Trong điều kiện dinh dưỡng đầy đủ và môi trường nuôi ổn định và được giữ đồng đều, chiều dài thu được cho thấy ở nghiệm thức II (phối trộn 5% probiotic) cho chiều

dài cao nhất và thấp nhất là nghiệm thức I (không phối trộn probiotic). Tuy nhiên, theo kết quả phân tích thống kê (bảng 4.20) thì lại sai khác không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ($P > 0,05$).

Chỉ tiêu về tỷ lệ sống

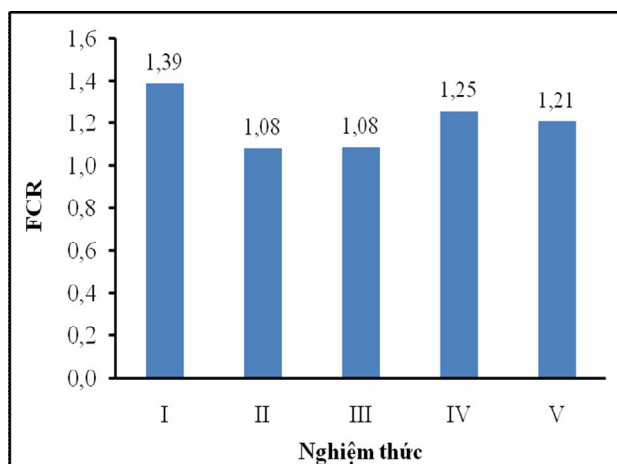
Từ kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ sống giữa các nghiệm thức tương đối cao. Tuy nhiên sự khác biệt về tỷ lệ sống giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$), chứng tỏ chất lượng thức ăn giữa các nghiệm thức không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của cá. Tỷ lệ sống của các nghiệm thức được thể hiện qua biểu đồ 4.4



Biểu đồ 1. Biến thiên tỷ lệ sống giữa các nghiệm thức.

Chỉ tiêu về hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR)

Qua biểu đồ 2 có thể nhận thấy FCR ở nghiệm thức I là cao nhất, FCR ở nghiệm thức II là thấp nhất.



Biểu đồ 2. Biến thiên hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) giữa các NT.

Sau khi tiến hành phân tích phương sai thì nhận thấy FCR giữa nghiệm thức I có sự khác biệt về mặt thống kê với các nghiệm thức còn lại ($P < 0,05$). Điều này chứng tỏ khi được cho ăn thức ăn có chứa một hàm lượng vừa đủ probiotic thì cá có khả năng hấp thụ thức ăn tốt hơn là không bổ sung hay bổ sung quá nhiều probiotic. Qua khảo sát các chỉ tiêu về chất lượng nước và tăng trưởng của cá thí nghiệm, có thể kết luận nghiệm thức II cho các thông số về các chỉ tiêu là tốt nhất, trong khi đó, nghiệm thức I lại cho thông số thấp nhất, các nghiệm thức còn lại cho thông số về các chỉ tiêu nằm ở khoảng trung bình. Vậy có thể kết luận phối trộn 5% probiotic vào thức ăn viên dành cho cá giúp cá lớn nhanh, khỏe mạnh, giảm FCR, nâng cao tỷ lệ sống. Sự phối trộn probiotic vừa đủ sẽ mang lại kết quả tốt nhất, bởi trong đường ruột cá, hệ vi sinh vật có lợi và có hại cân bằng nhau, nếu bổ sung quá nhiều probiotic, hay không bổ sung probiotic thì sự không cân bằng về số lượng vi khuẩn khiến cho cạnh tranh dinh dưỡng, vị trí, khối lượng các chất sinh ra bởi vi sinh vật của 2 nhóm vi khuẩn diễn ra. Điều này làm mất cân bằng hệ thống các nhóm vi khuẩn trong đường ruột, dẫn đến rối loạn khả năng tiêu hóa thức ăn cho cá.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết Luận

Chế phẩm probiotic tạo thành có chứa $1,201 \times 10^9$ tế bào *Bacillus subtilis*, 1563,56 đơn vị amylase; 11,08 đơn vị protease; 3076,64 đơn vị phytase, 4081,13 đơn vị cellulase; $1,11 \times 10^7$ tế bào *Lactobacillus acidophilus*; 44,02 g/L acid lactic; $2,57 \times 10^9$ tế bào *Saccharomyces cerevisiae*.

Chế phẩm probiotic thử nghiệm có khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh đường ruột như *E. coli*, *Samonella*.

Chế phẩm probiotic thử nghiệm có khả năng kích thích tốt khả năng tiêu hóa thức ăn cho cá cảnh khi được phối trộn vào thức ăn viên với tỷ lệ là 5%

Đề Nghị

Khảo sát kích thích khả năng tiêu hóa ở các loài động vật khác như gà, heo, chuột bằng phương pháp tiêm trực tiếp lên cơ thể chúng.

Cần có thêm những kiểm tra về tính an toàn của sản phẩm để bảo đảm tuyệt đối cho vật nuôi, thủy sản sử dụng, và đặc biệt bảo đảm an toàn cho sức khỏe con người khi sử dụng sản phẩm từ những động vật được ăn thức ăn probiotic

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội, 2006. *Bệnh học thủy sản*. NXB Nông Nghiệp, 423 trang.
- Huỳnh Muối Hên, 2005. *Nước thối nổi lên men*, LVTN, khoa Công Nghệ Thực Phẩm. Trường Đại học An Giang. Tỉnh An Giang. Việt Nam
- Lâm Thị Kim Châu, Nguyễn Như Nhứt, 2006. *Phương pháp kiểm tra một số enzyme dùng trong chăn nuôi*. Tủ sách Đại học Khoa học Tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh, 28 trang.
- Lê Thị Vu Lan, Phạm Minh Nhứt, 2008. *Thực tập vi sinh đại cương*. Tủ sách Đại học Khoa học Công Nghệ thành phố Hồ Chí Minh, 43 trang.

- Nguyễn Đức Lượng, 2002. *Vi sinh vật học công nghiệp*. Nhà xuất bản Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 371 trang.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền và Phạm Văn Ty, 2003. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục, thành phố Hồ Chí Minh, 520 trang.
- Nguyễn Lâm Dũng, Hoàng Đức Nhuận, 1976. *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học* tập I, II, III. Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật.
- Nguyễn Phú Hòa, 2000. *Bài giảng chất lượng nước trong nuôi trồng thủy sản*. Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.
- Nguyễn Thành Đạt và Nguyễn Duy Thảo, 1986. *Vi Sinh học*. Nhà xuất bản giáo dục, thành phố Hồ Chí Minh, 133 - 138.
- Nguyễn Vĩnh Phước, 1976. *Vi sinh vật gây bệnh thú y tập 1, 2, 3*. NXB Nông nghiệp Hà Nội.
- Phạm Văn Ty và Vũ Nguyên Thành, 2007. *Công nghệ sinh học – Công nghệ vi sinh và môi trường*. Nhà xuất bản Giáo dục, 128 – 146.