

Investigation of pests composition on rice and prevention measures from small rice leaffolder by herbal insecticides in spring season in Gia Binh district, Bac Ninh province

Nguyen Tuan Diep, Nguyen Binh Nhu

Abstract

The experiment was conducted on two rice varieties, including Q5 and Khang Dan 18 in spring season of 2016 in Gia Binh district, Bac Ninh province. The efficacy of herbal insecticide product extracted from jicama seeds and chili was evaluated on control of small rice leaffolder. The results showed that there were 12 rice pest species, belonging to 8 families of 6 orders were found and identified, of which Lepidoptera had the highest number of species (6 species). Small rice leaffolder, brown planthopper and white-backed planthopper were found throughout the crop season with high frequency while other species appeared sparsely. The small rice leaffolders consisted of two species, including *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia ruralis*, of which *C. medinalis* was the dominant species. In the spring crop season, 2 generations of small rice leaffolder occurred, of which the second generation caused the greatest damage to rice at reproductive phase with the density of 20 individuals/m² in Q5 variety and 15 individuals/m² in Khang Dan 18. The herbal pesticides extracted from jicama seeds and chili had the maximum efficacy in preventing small rice leaffolder at 81.47 - 82.61% after 7 days of spraying.

Keywords: Bac Ninh, rice variety Q5, Khang Dan 18, small rice leaffolder, botanical pesticides, spring crops

Ngày nhận bài: 20/6/2018
Ngày phản biện: 27/6/2018

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Liêm
Ngày duyệt đăng: 19/7/2018

CÁC ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI VÀ TẠO CHẾ PHẨM PROBIOTIC CỦA VI KHUẨN LACTIC PHÂN LẬP TỪ RUỘT GÀ

Nguyễn Thị Lâm Đoàn¹, Đặng Thảo Yến Linh¹

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là xác định đặc điểm phân loại của hai chủng (RG2.1 và RG8.1) có đặc tính probiotic phân lập từ ruột gà và tạo chế phẩm probiotic từ các chủng đó để ứng dụng bổ sung vào thức ăn chăn nuôi gia cầm. Kết quả chỉ ra chủng RG2.1 thuộc giống *Pediococcus*, chủng RG8.1 thuộc giống *Lactobacillus*. Thời gian lên men của hai chủng là 36 h. Môi trường lên men cải biến MRSII là môi trường rẻ tiền và dễ kiểm soát thay thế được môi trường MRS để lên men với thể tích lớn ứng dụng trong thực tiễn sản xuất. Chất mang tạo chế phẩm probiotic là bột cám gạo, nhiệt độ sấy 40°C cho tỉ lệ tế bào sống sót 43,29% (RG2.1), 45,57% (RG8.1). Kết quả thử nghiệm hai chủng không có đối kháng lẫn nhau, chế phẩm dạng bột của hai chủng này được phối trộn theo tỷ lệ 1/1 đựng trong túi polyetylen, bảo quản ở 4°C và nhiệt độ phòng trong thời gian 60 ngày. Chế phẩm hỗn hợp sau khi phối trộn có mật độ vi khuẩn lactic là $2,12 \times 10^9$ CFU/g. Sau 60 ngày bảo quản, mật độ vi khuẩn lactic trong chế phẩm là $0,37 \times 10^9$ CFU/g khi bảo quản ở 4°C, 2×10^6 CFU/g bảo quản ở nhiệt độ phòng. Chế phẩm probiotic từ 02 chủng này có thể ứng dụng trong chăn nuôi gia cầm.

Từ khóa: Gà, probiotic, vi khuẩn lactic, cám gạo

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, việc sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi đang ngày càng được quản lý chặt chẽ. Ngày 15 tháng 7 năm 2016, số lượng các loại kháng sinh cho phép có mặt trong thức ăn chỉ còn 15 loại (Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2016) và sẽ cấm hoàn toàn vào năm 2018 (Phạm Kim Đăng và *ctv.*, 2016). Chính vì vậy, nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học như probiotic bổ sung vào thức ăn

hoặc nước uống cho vật nuôi là cần thiết. Probiotic gồm các vi sinh vật sống có tác dụng cải thiện cân bằng của hệ vi sinh vật đường ruột (Fuller, 1989) nâng cao chất lượng thịt và cải thiện khả năng miễn dịch của vật nuôi đối với mầm bệnh, giúp giảm thiểu sử dụng thuốc kháng sinh và chất kích thích tăng trưởng gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người tiêu dùng (Phạm Kim Đăng và *ctv.*, 2016).

¹ Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Các loài vi sinh vật được sử dụng như nguồn probiotic rất phong phú, trong đó có vi khuẩn lactic (Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng, 2015), đặc biệt là giống *Lactobacillus* và *Pediococcus*. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy các chủng thuộc giống *Lactobacillus* và *Pediococcus* phát huy tác dụng có lợi bởi tăng cường khả năng miễn dịch của vật chủ, khả năng bám dính tốt, ngăn ngừa ung thư, giảm cholesterol, hoạt tính kháng khuẩn cao chống lại tác nhân gây bệnh và cân bằng thành phần vi sinh vật ruột (Chen *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015).

Chế phẩm probiotic gồm một hay nhiều chủng vi sinh vật. Chúng thường là những chủng phân lập từ khu hệ vi sinh vật đường ruột của nhiều loài động vật khác nhau. Nghiên cứu của Fuller (1989) đã chứng minh chế phẩm probiotic cho gia cầm nên được tạo ra từ chính các chủng được phân lập từ gia cầm. Hiện nay, các nghiên cứu sản xuất chế phẩm probiotic dùng trong chăn nuôi gia cầm ở nước ta còn hạn chế và chủ yếu tập trung nghiên cứu ảnh hưởng chế phẩm probiotic đến tốc độ sinh trưởng và chất lượng thịt gà ... (Nguyễn Tiến Toàn và Đỗ Văn Ninh, 2013; Phạm Kim Đăng và *ctv.*, 2016). Xuất phát từ thực tế trên và kế thừa kết quả nghiên cứu trước đó của nhóm tác giả đã đánh giá được 02 chủng vi khuẩn lactic phân lập từ ruột gà ri có hoạt tính probiotic (Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2018). Nghiên cứu này tiến hành nhằm xác định đặc điểm phân loại và tạo chế phẩm probiotic từ 02 chủng này làm cơ sở sản xuất chế phẩm ở quy mô lớn hơn để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi gia cầm nói chung và thức ăn chăn nuôi gà nói riêng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Các chủng vi khuẩn

02 chủng vi khuẩn lactic (RG2.1, RG8.1) được phân lập từ ruột gà ri, có hoạt tính probiotic (khả năng chịu pH thấp, chịu muối mật, sinh enzyme ngoại bào, kháng vi khuẩn gây bệnh, độ bám dính tốt) là kết quả nghiên cứu trước của nhóm tác giả (Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2018)

2.1.2. Môi trường nghiên cứu

Môi trường MRS dịch thể dùng để nuôi cấy và hoạt hóa các chủng vi khuẩn lactic (g/l): Glucose - 20,0; NaH_2PO_4 - 2,0; CH_3COONa - 5,0; Cao thịt - 10,0; $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$ - 2,0; Pepton - 10,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; Cao nấm men - 5,0; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; Tween

80 - 1,0 ml; Nước cất vừa đủ - 1 lít; pH 6,5; MRS agar dùng để xác định số lượng các chủng vi khuẩn lactic nghiên cứu: gồm các thành phần trên và thêm agar 18,0 g/l.

Môi trường MRS cải tiến (MRSI) như theo nghiên cứu của Mai Đàm Linh và cộng tác viên (2007) có cải biến: 100 g giá đỗ được đun sôi với 1000 ml nước cất trong 5 - 7 phút thu được dịch chiết giá đỗ. Chuẩn bị môi trường MRSI gồm 1000 ml dịch chiết giá đỗ, 20 g đường kính, 5 g cao nấm men.

Môi trường MRS cải tiến II (MRSII): 150 g giá đỗ đun sôi với 1000 ml nước cất trong 5 - 7 phút thu được dịch chiết giá đỗ. Chuẩn bị môi trường MRSII gồm 1000 ml dịch chiết giá đỗ, 20 g đường kính, ít muối NaCl khoảng 1 thìa sữa chua muối ăn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định đặc điểm phân loại vi khuẩn lactic probiotic

Các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa theo Bergey's (John *et al.*, 1994) kết hợp với phân loại vi khuẩn lactic của Axelsson (2004).

Phương pháp tiến hành xác định các đặc điểm hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc và catalase theo Nguyễn Lâm Dũng và cộng tác viên (1976) và Nguyễn Lâm Dũng (1983).

Xác định khả năng sinh khí từ đường glucose: Chủng lactic nuôi trong các ống nghiệm chứa 5 ml môi trường MRS dịch thể, bên trong đặt sẵn ống Durham, sau 24 h nuôi cấy chủng lên men đường, sinh khí sẽ đẩy ống Durham tạo thành một khoảng trống (Nguyễn Lâm Dũng, 1983).

Xác định khả năng sinh trưởng ở các nhiệt độ: Chủng vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ 10°C; 45°C; 55°C. Xác định khả năng sinh trưởng ở các pH: chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể có pH 4,4; 9,6 ở nhiệt độ 37°C. Xác định khả năng sinh trưởng ở các nồng độ muối: chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể có bổ sung NaCl 6,5; 18% ở nhiệt độ 37°C. Sau 48 h xác định sinh trưởng ở các nhiệt độ, pH, và nồng độ muối khác nhau bằng cách quan sát độ đục môi trường nuôi cấy, đo OD ở bước sóng 620 nm (Nguyễn Lâm Dũng và *ctv.*, 1976).

Kiểm tra khả năng di động: Chuẩn bị ống nghiệm chứa môi trường MRS bán lỏng (0,3 - 0,6% agar). Dùng que cấy có đầu nhọn cấy vi khuẩn theo kiểu chích sâu vào môi trường thạch bán lỏng. Đặt ống nghiệm thẳng đứng trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C sau 48 h quan sát. Vi khuẩn mọc lan rộng quanh vết cấy tức là chúng có khả năng di động. Vi khuẩn chỉ

mọc theo vết cấy tức là chúng không có khả năng di động (Nguyễn Lâm Dũng và *ctv.*, 1976).

Xác định khả năng lên men các loại đường: Sử dụng môi trường MRS lỏng trong đó glucose được thay thế bằng các loại đường nghiên cứu. Khả năng lên men đường được đánh giá qua sự đổi màu của chất chỉ thị Andrade trong môi trường nuôi cấy (Nguyễn Lâm Dũng, 1983).

2.2.2. Xây dựng đường cong sinh trưởng của các chủng có hoạt tính probiotic được nghiên cứu

Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy (2018) đã xác định được nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng của chủng vi khuẩn lactic nghiên cứu là 37°C, do đó thí nghiệm sẽ tiến hành nuôi cấy chủng trong môi trường MRS ở điều kiện 37°C. Chủng RG2.1 và RG8.1 được nuôi cấy tăng sinh, pha loãng và cấy vào môi trường MRS để có mật độ ban đầu khoảng 10^6 CFU/ml trong bình nuôi cấy. Sau đó tiến hành khảo sát sự tăng trưởng của chủng tại các thời điểm 0; 6; 12; 18; 24; 36; 48 và 72 h. Tại mỗi thời điểm tiến hành thu mẫu và khảo sát các chỉ tiêu mật độ vi khuẩn bằng cách đo OD_{620nm} , xây dựng đường cong sinh trưởng của các chủng (Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhật, 2014).

2.2.3. Xác định môi trường lên men thích hợp

Lên men thu sinh khối trong điều kiện nhiệt độ 37°C trong thời gian tối thích (kết quả thí nghiệm 2.2.2) cụ thể như sau:

Hai chủng RG2.1, RG8.1 được nhân giống cấp 1 trong mỗi ống nghiệm riêng rẽ chứa 10 ml môi trường dịch MRS trong tủ ấm 37°C trong 24 h, ống nghiệm cấp 1 này được nhân giống cấp 2 trong bình tam giác riêng biệt với 03 môi trường khác nhau (MRS và môi trường tự tạo MRS có cải tiến MRSI, MRSII) gồm các thành phần như phần 2.1. Các chủng này tiếp tục được lên men riêng rẽ trên 03 môi trường khác nhau đó tại nhiệt độ 37°C, thời gian xác định từ thí nghiệm 2.2.2 (Nguyễn Lâm Dũng, 1983). Đánh giá môi trường lên men thích hợp dựa vào mật độ tế bào của từng chủng sau lên men bằng cách nuôi cấy trên đĩa thạch và tính CFU/ml.

2.2.4. Tạo chế phẩm các chủng probiotic

Các chủng sau khi lên men ở môi trường được chọn trong phần 2.2.3, ly tâm 10000 vòng/10 phút/4°C, loại bớt dịch, trộn với chất mang. Hoàng Văn Tuấn và cộng tác viên (2013) đã chỉ ra rằng chất mang cám gạo có ảnh hưởng tốt đến sự sinh trưởng của các chủng lactic probiotic. Trong nghiên cứu này định hướng sử dụng chế phẩm probiotic cho gia cầm

nên chất mang cám gạo được sử dụng. Chất mang được hấp vô trùng ở 121°C trong 15 phút.

Nguyễn Hữu Thanh và Lê Xuân Anh (2010) đã tìm ra tỷ lệ phối trộn sinh khối vi khuẩn lactic với chất mang phù hợp khi tạo chế phẩm là 3/7 (theo khối lượng). Do đó, nghiên cứu tiến hành khảo sát theo tỷ lệ này và sử dụng chế độ sấy nhiệt bằng thiết bị tủ sấy thông thường (Binder) tại phòng thí nghiệm, nhiệt độ sấy 40°C trong 3 ngày. Xác định độ ẩm, mật độ tế bào sống sót, tỷ lệ tế bào sống sót của chế phẩm trước và sau sấy. Đánh giá mật độ tế bào sống sót bằng cách pha loãng mẫu và cấy trang trên bề mặt thạch để đếm số khuẩn lạc và xác định CFU/g.

Xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy khô, cân trọng lượng theo TCVN 4326-86.

2.2.5. Xác định khả năng đối kháng của các chủng probiotic

Tiến hành xác định tính đối kháng của 02 chủng nghiên cứu RG2.1 và RG8.1 theo phương pháp cấy vạch thẳng vuông góc trên đĩa thạch sử dụng môi trường MRS. Cấy mỗi chủng RG2.1 và RG8.1 dọc theo một đường thẳng riêng rẽ trên đĩa thạch, nuôi ở 37°C trong 24 h. Tiến hành cấy vi khuẩn hai chủng này theo các vạch ngang vuông góc với vạch vi khuẩn đã mọc, tiếp tục, nuôi ở 37°C trong 24 h, khả năng ức chế xuất hiện không mọc chéo (Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016).

2.2.6. Đánh giá bảo quản chế phẩm probiotic

Chế phẩm được bảo quản trong túi polyetylen bảo quản ở nhiệt độ lạnh 4°C và nhiệt độ phòng trong thời gian 60 ngày cứ 10 ngày lấy mẫu phân tích 1 lần. Đánh giá bảo quản chế phẩm thông qua mật độ vi khuẩn lactic sống sót bằng cách nuôi cấy và đếm khuẩn lạc, tính CFU/g.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Excel để tính các giá trị trung bình. Dùng ANOVA trong Excel để xử lý số liệu thống kê mô tả.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1 đến tháng 6 năm 2018 tại Khoa Công nghệ thực phẩm - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm phân loại của các chủng

Vi khuẩn lactic được xem là nhóm vi khuẩn an toàn (Generally Recognized As Safe - GRAS) (Leroy & De., 2004). Đặc biệt là giống *Lactobacillus* còn

được cơ quan Quản lý chất lượng thuốc của Úc (Therapeutic Goods Australia) xếp vào danh sách các thành phần được sử dụng như thành phần của thuốc (Australian Government, 2007). Để có thể sử dụng các chủng vi khuẩn lactic này làm probiotic thì cần biết chúng là giống gì và có an toàn không. Kết quả về đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của 02 chủng được tổng hợp ở Bảng 1.

Kết quả từ bảng 1 cho thấy 02 chủng vi khuẩn lactic đều là vi khuẩn gram +, không sinh bào tử, không có hoạt tính catalase. Sinh trưởng ở điều kiện vi hiếu khí tùy tiện trên môi trường MRS và không có khả năng di động. Quan sát tế bào dưới kính hiển vi điện tử cho thấy chủng RG2.1 là cầu khuẩn, chủng RG8.1 là trực khuẩn. Với các đặc điểm khác

trên bảng 1 so sánh với khóa phân loại của Bergey's (1994) kết hợp với phân loại vi khuẩn lactic của Axelsson (2004), có thể xếp chủng RG2.1 vào giống *Pediococcus*, chủng RG8.1 vào giống *Lactobacillus*.

Theo Bergey's (1994), cả hai giống này đều được cho là an toàn. Ngoài ra, một số nghiên cứu trước cũng chỉ ra chủng có hoạt tính probiotics từ giống *Lactobacillus* và *Pediococcus* là các vi khuẩn sống bổ sung vào thức ăn có tác động tích cực đối với vật chủ bởi cải thiện cân bằng vi sinh vật đường ruột, các chủng này cũng được tác giả cho thấy rất hay gặp trong ruột của động vật (Chen *et al.*, 2017). Vậy hai chủng này đều là hai chủng an toàn có thể sử dụng chúng làm probiotic để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi gà.

Bảng 1. Một số đặc điểm, hình thái, sinh lý, sinh hóa của các chủng

| Đặc điểm | RG2.1 | RG8.1 | Đặc điểm | RG2.1 | RG8.1 | Đặc điểm | RG2.1 | RG8.1 |
|----------------|--------------|-------------------|---------------------------|-------|-------|-------------------------------|----------|----------|
| Tế bào | | | Nhiệt độ sinh trưởng (°C) | | | Hô hấp | Tùy tiện | Tùy tiện |
| Hình dạng | Cầu | Que | 10 | ± | ± | Sinh khí | - | - |
| Kích thước | 1,0 - 2,0 µm | 0,5 × 6,0 - 10 µm | 45 | + | + | Khả năng sinh bào tử | - | - |
| Sắp xếp tế bào | Đôi, bốn | Đơn, đám | 55 | ± | - | Khả năng chịu NaCl (%) | | |
| Gram | + | + | pH sinh trưởng | | | 6,5 | + | ± |
| Khuẩn lạc | | | 4,4 | + | + | 18 | - | - |
| Hình dạng | Tròn, lồi | Tròn, lồi | 9,6 | - | - | Khả năng lên men một số đường | | |
| Màu sắc | Trắng sữa | Trắng ngà | Catalase | - | - | Lactose | ± | ± |
| Đường kính | 1,8 mm | 2,3 mm | Khả năng di động | - | - | Maltose | + | + |
| | | | | | | Mannitol | - | ± |
| | | | | | | Saccharose | ± | ± |

Ghi chú: + Khả năng sinh trưởng hoặc có khả năng sinh; ± Khả năng sinh trưởng yếu, khả năng lên men yếu; - Không sinh trưởng hoặc không có khả năng.

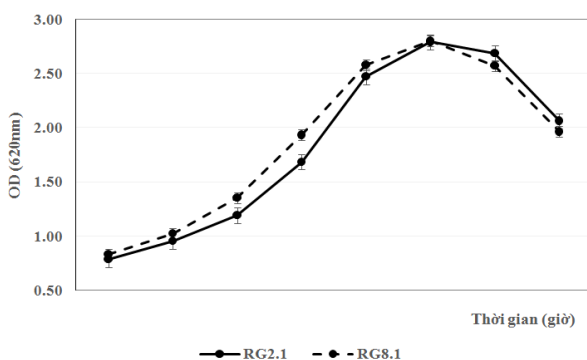


Hình 1. Hình thái tế bào của chủng vi khuẩn lactic RG2.1 (A), chủng RG8.1 (B)

3.2. Xây dựng đường cong sinh trưởng của các chủng vi khuẩn lactic probiotic

Để chuẩn bị cho lên men các chủng này cần được xác định các giai đoạn sinh trưởng nhằm chọn thời điểm lên men thích hợp nhất.

Kết quả chỉ ra 02 chủng vi khuẩn lactic ở giai đoạn từ 0 - 12 h số lượng vi khuẩn tăng ít, bắt đầu sinh trưởng và phát triển mạnh mẽ trong khoảng thời gian 12 - 24 h, giữ ở mức tương đối ổn định và mật độ tế bào trong môi trường cao trong thời gian 24 - 48 h đặc biệt cao nhất 36 h, số lượng tế bào giảm mạnh sau 48h do việc tiêu hao chất dinh dưỡng và việc tích lũy các chất thải độc hại. Do đó, thời gian lên men thu hồi sinh khối của các chủng probiotic thích hợp 36 h. Nghiên cứu này cũng đồng nhất với kết quả nghiên cứu Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhựt (2014), tác giả cũng xác định thời điểm 16 h chủng *Lactobacillus plantarum* SC01 sinh trưởng mạnh nhất và chính là giai đoạn chuyển tiếp từ phase lag sang phase log, 28 h là thời điểm mà mật độ tế bào của chủng này trong môi trường cao nhất.



Hình 2. Đường cong sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn lactic RG2.1 và RG8.1

3.3. Ảnh hưởng các môi trường lên men đến khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn lactic probiotic

Kết quả ở bảng 2 cho thấy môi trường MRS là tốt nhất cho sự sinh trưởng của 02 chủng vi khuẩn lactic này. Trong các môi trường tự tạo, môi trường MRSII cho mật độ tế bào thấp hơn môi trường MRSI nhưng các chủng vẫn đạt mức 10^9 CFU/ml. Qua kết quả trên cho thấy môi trường MRSII là môi trường rẻ tiền và dễ kiếm vì vậy có thể thay thế được môi trường MRS

(là một môi trường chứa nhiều hóa chất đắt tiền) và môi trường MRSI (có cao nấm men) để có thể lên men với thể tích lớn ứng dụng trong việc tạo chế phẩm trong chăn nuôi. Trong nghiên cứu này môi trường MRSII được chọn là môi trường lên men cho nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường lên men đến mật độ tế bào vi khuẩn lactic probiotic

| Chủng | Mật độ tế bào 10^9 CFU/ml | | |
|-------|-----------------------------|------------|------------|
| | MRS | MRSI | MRSII |
| RG2.1 | 28 ± 1,32 | 7,1 ± 1,14 | 5,3 ± 1,22 |
| RG8.1 | 63 ± 2,16 | 9,8 ± 1,02 | 6,7 ± 0,76 |

3.4. Tạo chế phẩm vi khuẩn lactic probiotic bổ sung vào thức ăn chăn nuôi cho gia cầm

Cám gạo thường được sử dụng trong chăn nuôi, chứa nhiều thành phần dinh dưỡng cơ bản như protein, tinh bột, axit béo, các hợp chất phenolic, vitamin nhóm B, khoáng vi lượng, rất giàu chất xơ hòa tan có chức năng quan trọng kích thích sự phát triển của nhiều loại vi khuẩn có lợi (Hoàng Văn Tuấn và ctv., 2013). Ngoài ra, tác giả cũng chứng minh cám gạo tốt cho các chủng vi khuẩn lactic probiotic kết hợp với mục đích ứng dụng chế phẩm để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi gia cầm nên chất mang được sử dụng trong nghiên cứu này là cám gạo.

Phương pháp sấy được lựa chọn cho nhóm vi khuẩn lactic có thể là phương pháp sấy đông khô, sấy chân không, sấy phun (Colette *et al.*, 2001). Tuy nhiên, để phù hợp với giá thành và quy mô sản xuất lớn nghiên cứu lựa chọn chế độ sấy nhiệt bằng thiết bị tủ sấy thông thường trong phòng thí nghiệm (Binder). Các bước tạo chế phẩm như mô tả phần 2.2.4, chế phẩm được xác định độ ẩm, mật độ tế bào sống sót, tỷ lệ tế bào sống sót trước và sau sấy.

Chế phẩm probiotic có tỷ lệ tế bào sống sót càng cao càng tốt và nên $\geq 30\%$, mật độ tế bào nên $\geq 10^6$ CFU/g chế phẩm (Shah, 2000). Đối với chủng RG2.1 sau sấy tỷ lệ tế bào sống sót còn 43,29 đối với chủng RG8.1 là 45,57% (Bảng 3). Chávez và Ledebor (2007) khi nghiên cứu điều kiện tạo chế phẩm vi khuẩn lactic đã sử dụng chế độ sấy phun và cho kết quả tỷ lệ sống sót là 44% và độ ẩm là 8,7%.

Bảng 3. Tỷ lệ tế bào hai chủng vi khuẩn RG2.1 và RG8.1 sống sót trong chế phẩm

| Chủng lactic | Độ ẩm ban đầu (%) | Mật độ tế bào ban đầu (10^9 CFU/g) | Độ ẩm sau sấy (%) | Mật độ tế bào sau sấy (10^9 CFU/g) | Tỷ lệ tế bào sống sót sau khi sấy (%) |
|--------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| RG2.1 | 22,38 | 4,32 | 10,79 | 1,87 | 43,29 |
| RG8.1 | 26,13 | 6,21 | 12,08 | 2,83 | 45,57 |

3.5. Tính đối kháng của các chủng vi khuẩn lactic probiotic nghiên cứu

Trên cơ sở đặc tính của 02 chủng vi khuẩn lactic probiotic đã tuyển chọn, mục đích nghiên cứu là tổ hợp các chủng lại nhằm kết hợp các đặc tính riêng của từng chủng bổ sung cho nhau để tạo thành một hỗn hợp chế phẩm tốt ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi gia cầm. Chính vì vậy sự tương tác và ảnh hưởng lẫn nhau của các chủng này là yếu tố quan trọng để xem xét liệu giữa chúng có sự đối kháng và ức chế nhau, làm giảm hoạt tính không. Bằng phương pháp cấy vạch thẳng vuông góc trên đĩa thạch kết quả cho thấy cả 02 chủng không có sự tác động ức chế lẫn nhau (Bảng 4).

Bảng 4. Tính đối kháng của 02 chủng RG2.1 và RG8.1

| Ký hiệu chủng | RG2.1 | RG8.1 |
|---------------|-------|-------|
| RG2.1 | - | - |
| RG8.1 | - | - |

Chú thích: - không đối kháng nhau

Chế phẩm của 02 chủng được phối trộn với tỷ lệ 1/1 đựng trong túi polyetylen để sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

3.6. Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến mật độ của tế bào vi khuẩn lactic trong chế phẩm probiotic hỗn hợp

Nghiên cứu đã sử dụng điều kiện bảo quản là 4°C và nhiệt độ phòng. Kết quả chỉ ra theo thời gian bảo quản mật độ của vi khuẩn lactic giảm dần, so với bảo quản lạnh bảo quản ở nhiệt độ phòng làm giảm đáng kể mật độ của vi khuẩn lactic trong chế phẩm.

Bảng 6. Ảnh hưởng điều kiện bảo quản đến mật độ tế bào vi khuẩn lactic probiotic trong thời gian bảo quản

| Thời gian (ngày) | Mật độ tế bào vi khuẩn ở các điều kiện bảo quản (10 ⁹ CFU/g) | |
|------------------|---|----------------|
| | 4°C | Nhiệt độ phòng |
| 0 | 2,12 ± 0,04 | 2,12 ± 0,04 |
| 10 | 1,89 ± 0,60 | 1,63 ± 0,32 |
| 20 | 1,63 ± 0,20 | 1,09 ± 0,15 |
| 30 | 1,51 ± 0,05 | 0,89 ± 0,05 |
| 40 | 1,24 ± 0,72 | 0,35 ± 0,02 |
| 50 | 0,99 ± 0,06 | 0,056 ± 0 |
| 60 | 0,37 ± 0,02 | 0,002 ± 0 |

Ban đầu số lượng tế bào là 2,12 × 10⁹ CFU/g chế phẩm, đối với bảo quản lạnh sau 40 ngày số lượng tế bào vẫn ổn định ở 1,24 × 10⁹ CFU/g, nhưng sau 50 và 60 ngày số lượng tế bào giảm mạnh còn 0,99 × 10⁹

và 0,37 × 10⁹ CFU/g. Đối với bảo quản ở nhiệt độ phòng sau 30 ngày mật độ tế bào bắt đầu giảm đặc biệt sau 60 ngày còn 10⁶ CFU/g. Nghiên cứu của Võ Ngọc Thanh Tâm và công tác viên (2009) khi nghiên cứu bảo quản chế phẩm probiotic cho cá trong đó *Lactobacillus acidophilus* sau 10 ngày bảo quản ở nhiệt độ thường mật độ tế bào là 10⁹ CFU/g chế phẩm còn sau 60 ngày bảo quản mật độ tế bào giảm xuống còn 10⁴ CFU/g. Theo Shah (2000), để phát huy được tác dụng của probiotic, vi khuẩn dùng làm probiotic phải sống và có mật độ tế bào đạt từ 10⁶ CFU/g chế phẩm trở lên. Như vậy, với thời gian bảo quản 60 ngày ở nhiệt độ phòng vẫn đảm bảo về số lượng vi khuẩn lactic trong chế phẩm.

IV. KẾT LUẬN

Từ 02 chủng vi khuẩn lactic (RG2.1 và RG8.1) có hoạt tính probiotic được phân lập từ ruột gà đã xác định chủng RG2.1 thuộc giống *Pediococcus*, chủng RG8.1 thuộc giống *Lactobacillus*. Thời gian lên men của hai chủng là 36 h. Môi trường lên men tự tạo MRSII là môi trường rẽ tiên, dễ kiểm và có thể thay thế được môi trường MRS để lên men với thể tích lớn. Chất mang dùng tạo chế phẩm probiotic là bột cám gạo, chế độ sấy nhiệt 40°C bằng tủ sấy thông thường sau sấy tỷ lệ tế bào sống sót còn 43,29% (RG2.1), 45,57% (RG8.1). Cả hai chủng không đối kháng nhau, chế phẩm dạng bột của hai chủng này được phối trộn theo tỷ lệ 1/1 đựng trong túi polyetylen, bảo quản ở 4°C và nhiệt độ phòng trong thời gian 60 ngày. Chế phẩm hỗn hợp của hai chủng sau khi phối trộn có mật độ vi khuẩn lactic là 2,12 × 10⁹ CFU/g. Sau khi bảo quản 60 ngày mật độ vi khuẩn lactic trong chế phẩm hỗn hợp bảo quản ở 4°C là 0,37 × 10⁹ CFU/g, ở nhiệt độ phòng còn 2 × 10⁶ CFU/g. Chế phẩm probiotic từ 02 chủng này có thể ứng dụng trong chăn nuôi gia cầm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2016. Thông tư số 06/2016/TT-BNNPTNT ngày 31 tháng 5 năm 2016 về việc hàm lượng kháng sinh được phép sử dụng trong thức ăn chăn nuôi gia súc, gia cầm, nhằm mục đích kích thích sinh trưởng.
- Nguyễn Lâm Dũng, 1983. *Thực tập vi sinh vật*. NXB Đại học và Trung học chuyên nghiệp. Hà Nội.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đức Đặng, Đặng Hồng Miên, Nguyễn Vĩnh Phước, Nguyễn Đình Quyến, Nguyễn Phùng Tiến, Phạm Văn Ty, 1976. *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật, tập 2*. NXB Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội.

- Phạm Kim Đăng, Nguyễn Đình Trinh, Nguyễn Hoàng Thịnh, Nguyễn Thị Phương Giang và Nguyễn Bá Tiếp**, 2016. Ảnh hưởng của probiotics *Bacillus* dạng bào tử chịu nhiệt đến năng suất, vi khuẩn và hình thái vi thể biểu mô đường ruột gà thịt lông màu. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật chăn nuôi*, 213: 40-46.
- Nguyễn Thị Lâm Đoàn và Nguyễn Thị Thanh Thủy**, 2018. Đánh giá đặc tính probiotic và xác định một số đặc điểm của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ ruột gà ri. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 7(92): 14-111.
- Dương Thu Hương và Phạm Kim Đăng**, 2015. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn lactic có đặc tính probiotic từ ruột gà. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*, 12: 78-86.
- Mai Đàm Linh, Đỗ Minh Phương, Phạm Thị Tuyết, Kiều Hữu Ánh, Nguyễn Thị Giang**, 2007. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic phân lập trên địa bàn Hà Nội. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Quốc gia Hà Nội*, 24: 211-226.
- Võ Ngọc Thanh Tâm, Trương Phước Thiên Hoàng, Ngô Văn Ngọc**, 2009. Sản xuất và thử nghiệm hiệu quả chế phẩm probiotic lên tỷ lệ sống, hệ số tiêu tổn thức ăn và tăng trọng của cá chép nhật (*Cyprinus carpio*). *Kỷ yếu hội nghị khoa học thủy sản toàn quốc 2009, Khoa Thủy sản - Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*, phần 1: 161-174.
- TCVN4326:1986**. Tiêu chuẩn Việt Nam 4326-86. Thức ăn chăn nuôi. Phương pháp xác định độ ẩm.
- Nguyễn Tiến Toàn, Đỗ Văn Ninh**, 2013. Nghiên cứu ảnh hưởng của lysine, probiotics đến tốc độ sinh trưởng và chất lượng thịt gà ta. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*, 4: 144- 149.
- Hoàng Văn Tuấn, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Lại**, 2013. Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết cám gạo đến hoạt tính của vi khuẩn probiotics. *Tạp chí Sinh học*, 35 (3): 195-199.
- Khuất Hữu Thanh, Lê Anh Xuân**, 2015. Nghiên cứu và ứng dụng chế phẩm sinh học BIO-TS3 trong nuôi tôm sú thâm canh. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 6: 132-138.
- Lê Ngọc Thùy Trang, Phạm Minh Nhật**, 2014. Phân lập và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản sinh hợp chất kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum*. *Tạp chí Sinh học*, 36(1): 97-106.
- Lê Thị Hải Yến, Nguyễn Đức Hiền**, 2016. Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 2: 26-32.
- Australian Government, Department of health and ageing, Therapeutic Goods Australia**, 2007. *Substances that may be use in listed medicines in Australia*.
- Axelsson L.**, 2004. *Chapter 1. Lactic acid Bacteria: Clasification and physiology. Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects*. Third Edition, Marcel Dekker, Inc. All Rights Reserved; 19-85.
- Chávez B. E. and Ledebouer A. M.**, 2007. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, 25: 1193-1201.
- Chen F., Zhu L. and Qiu H.**, 2017. Isolation and probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* and *Pediococcus pentosaceus* in specific pathogen free chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19 (2): 325-332.
- Colette D., Catherine S., Gerald F., Kevin C. and Paul R.**, 2001. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*, 11 (10): 801-808.
- Fuller.R.**, 1989. Probiotic in man and animals. *J.Appl. Bacteriol*, 66: 365-387.
- John G. H., Noel R. K., Peter H. A. S., James T. S. and Stanley T. W.**, 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams and Wilkins.
- Leroy F. and De V.**, 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Review, Trends in Food science and Technology*, 15 (2): 67-78.
- Shah N. P.**, 2000. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83 (4): 894-907.
- Zhang M., Fan X., Fang B., Ren V., Zhu C. and Zhu J.**, 2015. Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. *Journal of Microbiology*, 53: 398-405.

Classification characteristics and probiotic production of lactic acid bacteria isolated from chicken intestine

Nguyen Thi Lam Doan, Dang Thao Yen Linh

Abstract

The purpose of this study was to determine classification characteristics of two potentially probiotic strains (RG2.1, RG8.1) isolated from chicken intestine and to produce probiotics for adding to poultry feed. The data indicated that RG2.1 strain belonged to *Pediococcus* genus, RG8.1 strain belonged to *Lactobacillus*. The fermentation time

of both strains was 36 h. The MRSII medium was cheap, easy to use and could replace the MRS medium for large fermentations. This medium should be used in production practices. Rice bran was used as a carrier. Probiotic product was dried by incubators at temperature 40°C. The result showed that the living cell ratio was 43.29% (RG2.1), 45.57% (RG8.1) after drying. In addition, RG2.1 and RG8.1 strains didn't exhibit the antagonistic activities against each other. The powder of two strains was mixed in a ratio 1/1, put in polyethylene bags and preserved at cool condition 4°C and at room temperature in 60 days. The amount of lactic acid bacteria cell in probiotic product was 2.12×10^9 CFU/g. After 60 days of preservation at 4°C and room temperature, the bacteria density was 0.37×10^9 and 2×10^6 CFU/g, respectively. The primary results suggested that this probiotic powder could be used as probiotics in poultry.

Keywords: Chicken, probiotic, lactic acid bacteria, rice bran

Ngày nhận bài: 25/7/2018
Ngày phản biện: 31/7/2018

Người phản biện: PGS. TS. Lê Thanh Bình
Ngày duyệt đăng: 15/8/2018

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA NẤM *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÀ PHÊ CHÈ TẠI SƠN LA VÀ HIỆU LỰC CỦA MỘT SỐ THUỐC ỨC CHẾ SỰ PHÁT TRIỂN CỦA NẤM TRÊN MÔI TRƯỜNG NHÂN TẠO

Hoàng Văn Thành¹, Nguyễn Văn Tuất², Trịnh Xuân Hoạt³, Lê Thị Thảo¹

TÓM TẮT

Ở tỉnh Sơn La, bệnh thán thư là một trong những nguyên nhân chính làm giảm năng suất và sản lượng cà phê. 05 loài nấm thuộc chi *Colletotrichum*, gây bệnh thán thư trên cây cà phê ở Sơn La được nghiên cứu định loài gồm *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. fragariae*, *C. theobromicola*, *C. acutatum*. Tần nấm của các loài này đều phát triển tốt ở điều kiện nhiệt độ 28 - 30°C và phát triển chậm ở điều kiện dưới 20°C hoặc trên 35°C. Bào tử nấm nảy mầm tốt ở điều kiện nhiệt độ 25 - 30°C và nảy mầm yếu ở điều kiện dưới 20°C hoặc trên 35°C. Ở 3 điều kiện chiếu sáng 14 giờ sáng/10 giờ tối, 12 giờ tối/12 giờ sáng và 24 giờ tối, trong điều kiện nhiệt độ 28°C, trên môi trường PGA, các loài nấm *Colletotrichum* spp. đều phát triển tốt. Sau 3 ngày thí nghiệm, hiệu lực ức chế nấm của thuốc hóa học Antracol 70WP (hoạt chất Propineb), Anvil 5SC (hoạt chất Hexaconazole) đạt 100%. Hiệu lực ức chế nấm của chế phẩm sinh học CFO, thuốc Supercin 20SC (hoạt chất Ningnanmycin), chế phẩm Mantu và MBG đạt 21,81 - 44,19%. Sau 7 ngày thí nghiệm, hiệu lực của thuốc Antracol 70wp từ 70,29 - 91,64%, Anvil 5SC đạt 63,66 - 91,78%, CFO đạt 52,55 - 58,44%; hiệu lực ức chế nấm đạt thấp ở thuốc Supercin 20SC, chế phẩm MBG và Mantu đạt 17,61 - 27,14%.

Từ khóa: *Colletotrichum* spp., cà phê chè, bệnh thán thư, hiệu lực thuốc trừ nấm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Colletotrichum* giai đoạn hữu tính có tên Glomerella (thuộc họ Glomerellaceae, bộ Sordariomycetidae, lớp Sordariomycetes, ngành Ascomycota) gây hại trên nhiều loại cây trồng khác nhau cả giai đoạn trước và sau thu hoạch. Bằng kỹ thuật phân tử, đã xác định được 66 loài thuộc chi *Colletotrichum* sống phụ sinh, hoại sinh và ký sinh trên cây trồng (Hyde *et al.*, 2009). Bệnh thán thư trên cà phê được đã được ghi nhận ở Brazil vào cuối thế kỷ 19 và xác định loài *Colletotrichum coffeanum* là nguyên nhân gây bệnh (Waller, 1985). Ở miền Bắc Thái Lan, đã xác định được 5 loài nấm *C. gloeosporioides*, *C. kahawae*, *C. asianum*, *C. fructicola* và *C. siamense* cùng gây bệnh thán thư trên cây cà phê (Prihastuti *et al.*, 2009). Trên cây cà phê tại Việt Nam, đã xác định được các loài *C. gloeosporioides*,

C. acutatum, *C. capsici* và *C. boninense* cùng gây bệnh thán thư trên cây cà phê (Phuong, 2010).

Tổng diện tích cà phê của tỉnh Sơn La có khoảng 13.000 ha; trong đó, giống Catimor được trồng phổ biến. Trong những năm gần đây, nhiều loại đối tượng sâu, bệnh hại đã phát sinh và gây hại trên giống cà phê Catimor trồng tại nhiều vùng sinh thái khác nhau; trong đó, bệnh thán thư là đối tượng gây hại nguy hiểm nhất, gây rụng quả hàng loạt, ảnh hưởng lớn đến năng suất, chất lượng cà phê trên toàn tỉnh. Đến nay, chưa có nghiên cứu chuyên sâu nào về xác định nguyên nhân gây bệnh thán thư, cũng như giải pháp phòng trừ hiệu quả và bền vững. Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu xác định một số đặc điểm sinh học của nấm gây bệnh thán thư trên giống cà phê Catimor. Kết quả này sẽ góp phần cho công tác nghiên cứu biện pháp quản lý bệnh đạt hiệu quả.

¹ Trường Đại học Tây Bắc; ² Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam; ³ Viện Bảo vệ thực vật