

Nghiên cứu, đánh giá phương pháp bảo quản vi khuẩn *Vibrio fischeri* trong quy trình sản xuất KIT phát hiện nhanh độc chất trong nguồn nước

Bùi Thị Thu Hà¹, Nguyễn Thị Dung¹, Phạm Kiên Cường¹,
Nguyễn Văn Hoàng¹, Kiều Thị Hòa², Trần Thị Huyền Nga^{2,*}

¹Viện Công nghệ mới, Viện KH-CN Quân sự, 17 Hoàng Sâm, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 30 tháng 9 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 24 tháng 10 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 11 năm 2017

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này, hai phương pháp bảo quản lỏng và bảo quản đông khô đối với vi khuẩn *Vibrio fischeri* đã được đánh giá, so sánh nhằm tìm ra phương pháp và công thức bảo quản tối ưu cho quy trình sản xuất kit phát hiện nhanh một số loại độc tính cấp trong nước. Phương pháp bảo quản lỏng được thử nghiệm với sáu công thức như sau: Sacarose 12% (SA1); NaCl 5% (M5); sữa gầy 10% và NaCl 4% (MS4); sữa gầy 10% và NaCl 5% (MS5); Glyxerol 10% (MG2); sữa gầy 10% (S1), kết hợp chất bảo vệ và ổn định tế bào (bọc vi cầu alginate). Phương pháp đông khô được tiến hành bổ sung dinh dưỡng theo ba công thức, bao gồm sữa gầy 10% (ĐK1); sữa gầy 10% và NaCl 1% (ĐK2); Lactose 10% (ĐK3). Vi khuẩn sau đó được lưu giữ trong khoảng thời gian dài (6 tháng) ở các nhiệt độ -20°C, -5°C, 5°C. Kết quả cho thấy, phương pháp bảo quản lỏng bằng sữa gầy 10% (S1) kết hợp bọc vi cầu alginate cường độ phát quang sau 6 tháng ổn định và cao nhất, ở tháng thứ 4 cường độ phát quang vẫn còn đạt $9,8 \times 10^4$ RLU/ml.

Từ khóa: *Vibrio fischeri*, bảo quản lâu dài, đông khô, chế tạo kit.

1. Mở đầu

Các phương pháp xác định độc chất trong nguồn nước thông thường phải tiến hành trong phòng thí nghiệm, đòi hỏi các máy móc, thiết bị và dụng cụ chuyên dụng. Phương pháp phân tích hiện đại có thể phát hiện các chất ở nồng độ vết như phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS), plasma cảm ứng (ICP) quang phổ phát xạ nguyên tử và phương pháp khối

phổ plasma cảm ứng (ICP-MS), thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), hệ thống sắc ký khí khối phổ (GC-MS)... Tuy nhiên trong điều kiện thực địa ngoài hiện trường hoặc trong những tình huống độc cấp tính thì các phương pháp này lại không thể đáp ứng yêu cầu về thời gian phải rất ngắn (các kiểm tra nhanh trước khi sử dụng) [1].

Hiện nay ở nước ta, các vấn đề nhiễm độc tính cấp trong môi trường nước do ô nhiễm kim loại nặng và thuốc bảo vệ thực vật đang trở thành vấn đề nguy hiểm. Hàm lượng đồng, chì, cadimi, asen... trong nhiều nguồn nước dùng cho sinh hoạt cao vượt ngưỡng cho phép nhiều

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-983077505
Email: tranthihuyennga@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.4160>

lần. Các độc chất này có khả năng gây độc, gây bệnh nguy hiểm, thậm chí là tử vong cho con người và động thực vật [1].

Ngày nay, một trong những phương pháp thường được sử dụng nhiều để phát hiện nhanh độc tính cấp trong môi trường nước đối với các kim loại nặng và thuốc bảo vệ thực vật trong nước là ứng dụng cảm biến sinh học có sử dụng vi khuẩn phát quang *Vibrio fischeri* trong các bộ kit. *Vibrio fischeri* là một loài vi khuẩn dị dưỡng, gram âm, dạng hình que, có hai roi hỗ trợ di chuyển và có khả năng phát quang nhờ sản phẩm phụ của quá trình hô hấp nội bào [3,4]. Việc xuất hiện các độc chất gây rối loạn hoạt động sống bình thường của vi khuẩn làm cản trở quá trình hô hấp, khiến chúng giảm khả năng phát quang [5].

Đặc điểm phát quang của *Vibrio fischeri* đã được ứng dụng để nghiên cứu phát hiện độc tính của môi trường nước. Trên thế giới, các nhà khoa học, công ty thương mại đã chế tạo thành công bộ thuốc thử Microtox (Hoa Kỳ) có thành phần chủ yếu là *Vibrio fischeri* dạng đông khô. Bộ thuốc thử trên có thể phát hiện khoảng 2700 hoá chất, trong thời gian rút ngắn còn 15 – 60 phút và chi phí thấp [6]. Tuy nhiên, ngoài những ưu điểm đã được biết đến thì để ứng dụng trong điều kiện thực địa, bộ kit này vẫn còn một số tồn tại như: bảo quản thuốc thử cần nhiệt độ thấp (-15 °C đến - 25°C), mất thêm thời gian để hoạt hóa vi khuẩn. Ở Việt Nam, việc sử dụng vi khuẩn được tiêu chuẩn hóa trong TCVN 6831:2010 và được đề cập trong nhiều nghiên cứu. Việc sử dụng vi khuẩn *Vibrio fischeri* để phát hiện các độc chất trong nước hiện nay vẫn cần nhập ngoại bộ kit, tốn nhiều thời gian và kinh phí và đặc biệt là chưa đánh giá độc tính cho hỗn hợp độc chất ngoài hiện trường. Do đó, việc nghiên cứu các điều kiện bảo quản vi khuẩn *Vibrio fischeri* tạo cơ sở khoa học cho việc sản xuất kit phát hiện nhanh độc tính cấp của nước, ứng dụng các trong hoạt động thực địa. Đây là một hướng rất mới, có tiềm năng để tạo ra bộ kit phát hiện nhanh độc tính cấp của nước với nguồn nguyên liệu tại chỗ, sản xuất tại Việt Nam, có chi phí rẻ và phù hợp với điều kiện ở Việt Nam.

2. Thực nghiệm

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn *Vibrio fischeri* sử dụng cho nghiên cứu được phân lập từ nước đầm nuôi tôm Đình Vũ, Hải Phòng, đã được định loại bằng trình tự đoạn gen 16S rARN.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy vi sinh vật và bọc vi cầu alginate

- Vi khuẩn được nuôi cấy ở 26°C, pH 6-7, NaCl 2%, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong môi trường photobacterium có thành phần trong 1 lít môi trường (g/L): CaCl₂.2H₂O 1,5g; MgCl₂.6H₂O 5,5g; MgSO₄.7H₂O 6,9g; pepton 5g; KCl 0,7g; NaCl 28,2g; Cao nấm men 5g [2].

- Quá trình bọc vi khuẩn bằng vi cầu alginate được thực hiện theo Dedi F. và cộng sự [3]. Theo đó, các bước thực hiện gồm:

+ Pha 1,5 ml dung dịch alginate (2% w/v) trộn với chất lỏng parafin (4,5 ml), và 2-3 giọt Tween 80 đặt trên máy khuấy từ ở tốc độ 900 vòng/phút trong 20 phút để tạo thành hỗn hợp nhũ tương.

+ Bổ sung 1,5 ml dịch vi khuẩn *Vibrio fischeri* vào hỗn hợp nhũ tương, trộn đều trên máy khuấy tốc độ 250 vòng/phút trong 10 phút.

+ Hỗn hợp nhũ tương và vi khuẩn được bổ sung CaCl₂ 0,15M- parafin (tỷ lệ 2:1 v/v), khuấy nhẹ hỗn hợp ở 80 vòng/phút.

+ Vi khuẩn *Vibrio fischeri* sau khi được bọc bằng các vi cầu alginate được thu lại bằng ly tâm 1000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó được rửa lại 3 lần bằng nước vô trùng.

+ Vi cầu alginate thu được sau lọc được lưu giữ ở 5°C trong dung dịch CaCl₂ 3%.

- Dung dịch pha loãng vi khuẩn bằng NaCl 2% để đảm bảo áp suất thẩm thấu.

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp bảo quản lỏng và phương pháp đông khô với nhiệt độ lưu giữ khác nhau.

2.2.2. Phương pháp bảo quản lỏng

Khảo sát với sáu công thức bảo quản bao gồm: Sacarose 12% (SA1); NaCl 5% (M5); sữa gầy 10% và NaCl 4% (MS4); sữa gầy 10% và NaCl 5% (MS5); Glyxerol 10% (MG2); sữa gầy 10% (S1). Các điều kiện bảo quản được kết hợp bọc vi cầu alginate [7,8]. Các bước thực hiện:

- Sử dụng vi khuẩn tươi đã được hoạt hóa và nuôi trong môi trường Photobacterium, dịch vi khuẩn được ly tâm 2000 v/p, trong 20-25 phút, thu lấy tế bào.

- Bổ sung các chất bảo quản khác nhau, với các nồng độ khác nhau vào các ống riêng biệt có hàm lượng tế bào vi khuẩn tương đồng để lựa chọn công thức bảo quản với các chất bảo quản và nồng độ phù hợp nhất.

- Các ống bảo quản sau đó được bọc vi cầu alginate để ổn định cường độ phát quang và tăng độ nhạy. Nhiệt độ lựa chọn cho thí nghiệm này là 5°C.

- Các ống được lấy mẫu tần suất 1 tháng/lần, trong vòng 6 tháng, đo cường độ phát quang bằng Deltax II để đánh giá mức độ, nhiệt độ, chất bảo quản và thời gian bảo quản phù hợp.

2.2.3. Phương pháp bảo quản đông khô

- Phương pháp bảo quản đông khô được thực hiện với ba công thức gồm: sữa gầy 10% (ĐK1); sữa gầy 10% và NaCl 1% (ĐK2); Lactose 10% (ĐK3) [9,10]. Các bước thực hiện:

- Sử dụng vi khuẩn tươi đã được hoạt hóa và nuôi trong môi trường Photobacterium, dịch vi khuẩn được ly tâm 2000 v/p, trong 20-25 phút, thu lấy tế bào.

- Hòa lại dịch vi khuẩn trong các thành phần môi trường (ĐK1, ĐK2, ĐK3), mật độ vi khuẩn đạt 5×10^9 CFU/g.

- Dịch vi khuẩn sau khi hòa lại được để lạnh -20°C tạo thành đá trong 24 giờ.

- Tiến hành đông khô trong thời gian 48-50 giờ cho đến khi đạt khô xốp hoàn toàn (độ ẩm $\approx 5\%$).

- Sản phẩm sau đông khô được bảo quản ở 3 điều kiện nhiệt độ (-20°C, -5°C, 5°C) và định

kỳ lấy mẫu, hoạt hóa bằng NaCl 2% để đo cường độ phát quang của vi khuẩn sau mỗi khoảng thời gian (1 tháng/lần trong vòng 6 tháng) để đánh giá hiệu quả của các thành phần trong ba công thức đông khô và ba nhiệt độ bảo quản phù hợp sau khi đông khô.

3. Kết quả và biện luận

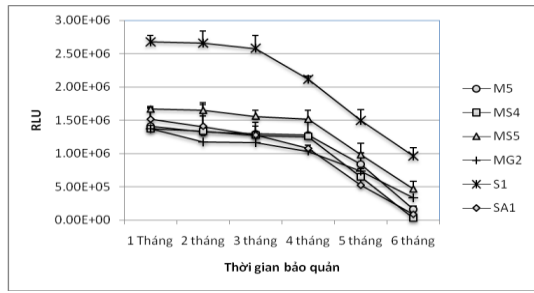
3.1. Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản

3.1.1. Bảo quản vi khuẩn *Vibrio fischeri* dạng lỏng

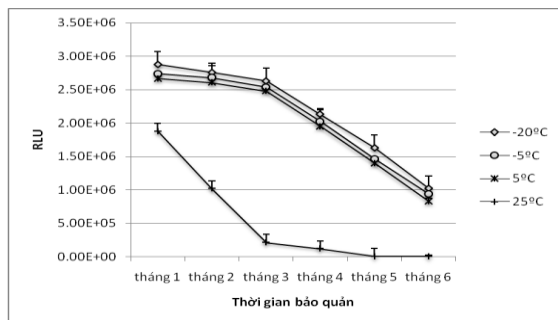
Ảnh hưởng của thành phần chất bảo quản:

Đánh giá ảnh hưởng của thành phần chất bảo quản, vi khuẩn được bảo quản lỏng kết hợp bọc vi cầu alginate với 6 công thức khác nhau, được kí hiệu trong mục 2.2.1, và được lưu giữ ở cùng một nhiệt độ (5°C). Kết quả cường độ phát quang của *Vibrio fischeri* sau các khoảng thời gian bảo quản được thể hiện tại Hình 1.

Từ hình 1 nhận thấy cường độ phát quang của vi khuẩn trong mỗi phương án bảo quản giảm nhanh hơn từ tháng thứ 4 (khoảng 20-30%) và cường độ phát quang đo được còn đáng kể ở tháng thứ 6 (10^5 - 10^6 RLU/ml). Mẫu bảo quản bằng sữa gầy 10% (S1) có cường độ phát quang cao nhất so với năm công thức còn lại, và khá cao so với các công thức của Stefanie, Peiren [11,12]. Quá trình bảo quản trong thời gian dài luôn giữ được mức cường độ trong khoảng 10^5 - 10^6 RLU/ml đảm bảo cho quá trình thử nghiệm độc tính. Do đó, sữa gầy được lựa chọn là phương pháp tối ưu cho lưu trữ vi khuẩn trong môi trường lỏng ở điều kiện lạnh (5°C) do có khả năng bảo vệ tế bào trong điều kiện khắc nghiệt, giúp vi khuẩn thích ứng với môi trường nuôi cấy nhanh chóng, và độ phát quang sinh học cao và ổn định; trong khi đó, sản phẩm Microtox Model 500 hay Microtox FX của Azur Environmental [12] chỉ chứa NaCl và nước cất, do đó cần nhiều thời gian để hoạt hóa vi khuẩn, phép thử sẽ mất thêm nhiều thời gian. Như vậy, bảo quản lỏng bằng môi trường với sữa gầy 10% (ĐK1) kết hợp bọc trong vi cầu alginate giúp lưu giữ ánh sáng ở mức cao nhất trong các khoảng thời gian nghiên cứu.



Hình 1. Sự ảnh hưởng của thành phần chất bảo quản đến độ phát quang của vi khuẩn.



Hình 2. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ khi bảo quản với sữa gầy 10% (S1) đến độ phát quang của vi khuẩn.

Ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản:

Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến điều kiện bảo quản, chúng tôi đã sử dụng kết quả từ thí nghiệm trên, sữa gầy 10% (S1). Kết quả được minh họa trong Hình 2.

Hình 2 cho thấy bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho được *Vibrio fischeri* có cường độ phát quang cao hơn so với bảo quản ở các nhiệt độ khác (-5°C, 5°C, 25°C). Ở nhiệt độ -20°C mức giảm ánh sáng chậm và ổn định hơn sau các tháng. Khả năng bảo quản giảm dần ở các mức nhiệt độ theo chiều hướng -20°C > -5°C > 5°C > 25°C, chỉ riêng bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) vi khuẩn *Vibrio fischeri* có cường độ phát đạt giá trị nhỏ hơn hẳn và giảm mạnh ở các khoảng thời gian bảo quản. Cụ thể cường độ phát quang còn lại sau 6 tháng chỉ bằng 1/1500 lần so với bảo quản ở -20°C, -5°C, 5°C trong cùng một phương pháp bảo quản. Ở nhiệt độ -20°C, -5°C, 5°C cho khả năng bảo quản tương đối cao, trên 28% sau 6 tháng bảo quản và chênh lệch cường độ quang giữa ba nhiệt độ bảo quản không lớn, chỉ khoảng 2-6%.

Vi vậy để thuận lợi, đảm bảo cho sử dụng khi thực địa vùng sâu, vùng xa, nhiệt độ bảo quản được lựa chọn tối ưu ở 5°C.

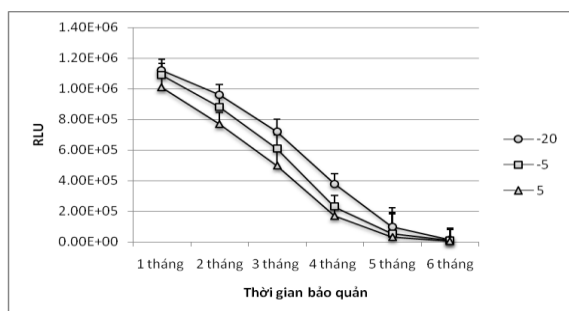
3.1.2. Bảo quản *Vibrio fischeri* dạng đông khô

Vi khuẩn sau khi đông lạnh ở -20°C được tiến hành đông khô. Quá trình lưu giữ ở các khoảng thời gian đo được cường độ phát quang trong Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thành phần đông khô và nhiệt độ bảo quản đến cường độ phát quang của vi khuẩn *Vibrio fischeri*

TT	Thời gian	Nhiệt độ (°C)	Cường độ phát quang ĐK1 (RLU/ml)	Cường độ phát quang ĐK2 (RLU/ml)	Cường độ phát quang ĐK3 (RLU/ml)
1	1 tháng	-20	(1,1±0,04)x10 ⁶	(1,0±0,09)x10 ⁶	(8,1±0,11)x10 ⁶
2		-5	(1,09±0,07)x10 ⁶	(1,00±0,08)x10 ⁶	(7,80±0,2)x10 ⁵
3		5	(1,01±0,1)x10 ⁶	(9,50±0,12)x10 ⁵	(7,10±0,09)x10 ⁵
4	2 tháng	-20	(9,60±0,4)x10 ⁵	(9,20±0,32)x10 ⁵	(6,40±0,13)x10 ⁵
5		-5	(8,80±0,08)x10 ⁵	(8,80±0,14)x10 ⁵	(6,10±0,15)x10 ⁵
6		5	(7,70±0,1)x10 ⁵	(8,10±0,23)x10 ⁵	(5,50±0,24)x10 ⁵
7	3 tháng	-20	(7,20±0,07)x10 ⁵	(5,20±0,09)x10 ⁵	(3,20±0,27)x10 ⁵
8		-5	(6,10±0,4)x10 ⁵	(4,70±0,16)x10 ⁵	(2,60±0,12)x10 ⁵
9		5	(5,00±0,08)x10 ⁵	(4,60±0,22)x10 ⁵	(2,10±0,14)x10 ⁵
10	4 tháng	-20	(3,80±0,2)x10 ⁵	(1,20±0,14)x10 ⁵	(6,00±0,22)x10 ⁴
11		-5	(2,30±0,1)x10 ⁵	(9,80±0,28)x10 ⁴	(5,80±0,21)x10 ⁴
12		5	(1,70±0,03)x10 ⁵	(8,60±0,24)x10 ⁴	(5,20±0,14)x10 ⁴

TT	Thời gian	Nhiệt độ (°C)	Cường độ phát quang ĐK1 (RLU/ml)	Cường độ phát quang ĐK2 (RLU/ml)	Cường độ phát quang ĐK3 (RLU/ml)
13	5 tháng	-20	$(9,80 \pm 0,06) \times 10^4$	$(5,10 \pm 0,31) \times 10^3$	$(1,10 \pm 0,09) \times 10^4$
14		-5	$(5,60 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,50 \pm 0,09) \times 10^3$	$(8,20 \pm 0,08) \times 10^3$
15		5	$(3,30 \pm 0,4) \times 10^4$	$(4,10 \pm 0,12) \times 10^3$	$(7,60 \pm 0,09) \times 10^3$
16	6 tháng	-20	$(1,20 \pm 0,09) \times 10^4$	$(2,10 \pm 0,24) \times 10^3$	$(6,30 \pm 0,09) \times 10^3$
17		-5	$(8,10 \pm 0,07) \times 10^3$	$(1,70 \pm 0,15) \times 10^3$	$(1,20 \pm 0,11) \times 10^3$
18		5	$(5,00 \pm 0,1) \times 10^3$	$(3,80 \pm 0,18) \times 10^2$	$(5,60 \pm 0,08) \times 10^2$



Hình 3. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ khi bảo quản vi khuẩn đông khô với sữa gầy 10% đến độ phát quang của vi khuẩn.

Kết quả cho thấy, bảo quản bằng sữa gầy 10% trong môi trường Photobacterium (ĐK1) mang lại hiệu quả cao hơn so với ĐK2 và ĐK3. Tương đồng khi bảo quản lỏng, môi trường sữa gầy 10% cũng cho hiệu quả cao nhất, tuy nhiên giá trị cường độ phát quang đo được khi đông khô thấp hơn rất nhiều so với bảo quản lỏng. Trong cùng điều kiện đông khô thích hợp nhất (ĐK1), nhiệt độ bảo quản có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng phát quang của vi khuẩn, được thể hiện trên Hình 3.

Hình 3 cho thấy vi khuẩn sau đông khô lưu giữ ở -20°C có cường độ phát quang lớn nhất và giảm dần theo chiều hướng -20°C > -5°C > 5°C.

Như vậy, nghiên cứu này cho thấy cả hai phương pháp bảo quản lỏng và đông khô đều có khả năng bảo quản vi khuẩn trong thời gian tương đối dài (6 tháng). Tuy nhiên, phương pháp bảo quản lỏng với sữa gầy 10% (S1) mang lại hiệu quả bảo quản và sự ổn định phát sáng cao hơn đông khô. Đây cũng chính là ưu điểm của phương pháp này so với các sản phẩm nhập ngoại như Microtox Model 2, Microtox FX [12].

4. Kết luận

- Phương pháp bảo quản lỏng và phương pháp đông khô với các công thức hoá chất khác nhau đều có khả năng bảo quản vi khuẩn trong thời gian tương đối dài (6 tháng), nhiệt độ lựa chọn phù hợp ở điều kiện Việt Nam là 5°C.

- Phương pháp bảo quản lỏng đảm bảo hiệu quả phát quang của vi khuẩn *Vibrio fischeri* tốt hơn so với phương pháp đông khô, phương án bảo quản tối ưu nhất là môi trường sữa gầy 10% (S1) kết hợp bọc vi cầu alginate, lưu giữ ở nhiệt độ 5°C.

Lời cảm ơn

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Quốc phòng: “Nghiên cứu chế tạo kit phát hiện nhanh độc tính của nguồn nước cấp cho sinh hoạt, ứng dụng trong hoạt động dã ngoại của bộ đội”

Tài liệu tham khảo

- [1] Đỗ Hồng Lan Chi (2006), “Nghiên cứu sử dụng công cụ học đánh giá nguy cơ của nước thải công nghiệp đối với hệ sinh thái lưu vực sông Sài Gòn-Đồng Nai”, Tạp chí phát triển KH&CN, tập 9, số 01 – 2006.
- [2] Bio fax Photobacterium Agar (2016), Flonn Scientific, inc, Publication No. 11040.
- [3] Coleman R.N. and Qureshi A.A. (1985), “Microtox and Spirillum volutants tests for assessing toxicity of environmental samples”, Bulletin of Environmental Contamination. Vol 35(4). pp 443-451.

- [4] Dedi F., L.Y. Heng, S. Surif, A. Ahmad and T.L. Ling (2014), "Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in Alginate Microspheres for Monitoring Heavy Metal Toxicity in Environmental Waters", *Sensors and Actuators B: Chemica*. Vol 14. pp. 23248-23268.
- [5] Ting W., Y.Liu , D.Wang , Z. .Lin , Q.An , C.Yin and Y. Liu (2016), "The joint effects of sulfonamides and quorum sensing inhibitors on *Vibrio fischeri*: Differences between the acute and chronic mixed toxicity mechanisms", *Journal of Hazardous Materials*.Vol 310. pp. 56-67.
- [6] Xiaoyan Y. M., X.C.Wang, H.H.Ngo, W.Guo, M.N.Wu and N. Wang (2014). Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Science of The Total Environment*. Vol 15. pp. 468-469.
- [7] Reteuna C., P. Vaseur and R. Cabridenc (1989). Performances of three bacterial assays in toxicity assessment. *Hydrobiologia*. Vol 188. pp. 149-153.
- [8] Yaashikaa P. R., A. Saravanan and P. S. Kumar (2016), "Isolation and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from prawn (*Penaeus monodon*) seafood: Preservation strategies", *Microbial Pathogenesis*. Vol 99. pp. 5-13.
- [9] Stefanie S.,G. Francisco and L.David (2006). Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *Journal of Microbiological Methods*. Vol 67(2). pp. 321-329.
- [10] Peiren J., B. Joke, P. De Vos & L.Elke, C.Dominique, H.Sylviane, B.Evelyne, B. Chantal, P.Javier, A. R.María, M. M.Carmen and R.A.David (2015). Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 88 (9). pp 3559-3571.
- [11] Zhao G., and G. Zhang (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of applied microbiology* Vol 99 (2). pp. 333-338.
- [12] Chi-Ying H., T.Meng-Hsiun, K.R.David and C.P.Oscar (2004). Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the Microtox chronic toxicity test. *The Science of the Total Environment*. Vol 320. pp.37-50.

Study the Preservation Methods of *Vibrio fischeri* to Toxicant Detecting Kit

Bui Thi Thu Ha¹, Nguyen Thi Dung¹, Pham Kien Cuong¹,
Nguyen Van Hoang¹, Kieu Thi Hoa², Tran Thi Huyen Nga²

¹*Institute of New Technology, Academy of Military Science and Technology,
17 Hoang Sam, Hanoi, Vietnam*

²*VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

Abstract: This study focused on comparing two preservation methods of *Vibrio fischeri*: liquid storage and freeze-dried storage to find out the optimal condition and formulation for kit production. The liquid preservation method is based on six formulas of nutritional supplements according to six formulas (Sacarose 12%; NaCl 5%; skimmed milk 10% and NaCl 4%; skimmed milk 10% and NaCl 5%; Glyxerol 10%; skimmed milk 10%), component for cell protection and cell stabilization (combined with alginate microcapsules), then stored for six months at the temperatures of -20°C, -5°C, 5°C and 25°C. The freeze-dried method is based on three formulas, including skimmed milk 10%; skimmed milk 10% and NaCl 1%; Lactose 10%. The samples were then stored for a 6-month period at -20°C, -5°C and 5°C. The results showed that the liquid preservation method with 10% skimmed milk (S1) combined with alginate microcapsules, luminous intensity after 6 months was stable and highest. The luminous intensity of S1 was 9.8×10^4 RLU /ml after 4 months.

Keywords: *Vibrio fischeri*, liquid storage, freeze- drying storage, kit manufacture.