



Original Article

Inhibitory Effects of Microalgal Biofilm on *Vibrio parahaemolyticus*

Pham Thi Luong Hang^{1,2,*}, Tran Van Thang², Truong Quynh Chi²,
Ngo Thi Trang², Le Van Nhat Anh¹, Le Van Khoa³

¹HUS High School for Gifted Students, VNU University of Science,
182 Luong The Vinh, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

²VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

³Vietnam National University of Agriculture, Trau Quy, Gia Lam, Hanoi, Vietnam

Received 05th June 2024

Revised 24th October 2024; Accepted November 2024

Abstract: Microalgae are primary producers, the first trophic level in the food webs of aquatic ecosystems. Therefore, they have many potential applications in aquaculture. This study aimed to create autotrophic biofilms from microalgae strains belonging to the Nostocaceae, Protosiphonaceae, and Scenedesmaceae, isolated in Vietnam and to select a microalgal biofilm capable of inhibiting *Vibrio parahaemolyticus*. The microalgal biofilms were created by attaching the microalgal strains (cyanobacterium and green algae) to substrates (coconut fibre, sugarcane bagasse and cheesecloth). Additionally, the inhibitory effect of the microalgal biofilm on *V. parahaemolyticus* was evaluated based on the reduction proportion of *V. parahaemolyticus* cell numbers in an environment with the microalgal biofilm (co-culture method) compared to those in an environment without microalgal biofilm. The results showed that coconut fibre and cheesecloth had higher coverage density and biomass content of microalgae after 72 hours of biofilm formation than the sugarcane bagasse. We also found that microalgal biofilms formed by the combination of a cyanobacterial strain NK1111 with a green microalgal strain MBN1 or MHN122 reduced 76.2% - 99.8% of *V. parahaemolyticus* in 96 - 120 hours of co-culture. Meanwhile, microalgal biofilm formed by the strain NK1111 and a green microalgal strain MHB231 inhibited 91.8% of *V. parahaemolyticus* bacterium as early as 24 hours and inhibited 99.4% of this bacteria at 120 hours of co-culture. Therefore, the microalgal biofilms consisting of the strain NK1111 and the strain MHB231 on cheesecloth or coconut fibre substrate are highly appreciated for their potential application in shrimp farms in Vietnam.

Keywords: Autotrophic biofilm, Antibacterial activity, Cyanobacteria, Co-culture method, Microalgae, *Vibrio parahaemolyticus*.

* Corresponding author.

E-mail address: luonghang@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5751>

Tác dụng ức chế của màng vi tảo đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Phạm Thị Lương Hằng^{1,2,*}, Trần Văn Thắng², Trương Quỳnh Chi²,
Ngô Thị Trang², Lê Văn Nhật Anh¹, Lê Văn Khoa³

¹Trường Trung học phổ thông chuyên Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội, 182 Lương Thế Vinh, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 05 tháng 6 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 24 tháng 10 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày tháng 11 năm 2024

Tóm tắt: Vi tảo là nhóm sinh vật sản xuất, là mắt xích đầu tiên trong các lưới thức ăn của các hệ sinh thái thủy vực. Vì vậy, chúng có nhiều tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản. Mục tiêu của nghiên cứu này là tạo ra được các màng sinh học tự dưỡng từ các chủng vi tảo thuộc các họ Nostocaceae, Protosiphonaceae và Scenedesmaceae phân lập tại Việt Nam và lựa chọn được một loại màng có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Màng vi tảo được tạo ra bằng cách gắn các chủng vi tảo (vi khuẩn lam và vi tảo lục) lên các vật liệu (xơ dừa, bã mía hoặc vải thưa); đồng thời, khả năng ức chế của màng vi tảo đối với *V. parahaemolyticus* được đánh giá dựa vào sự giảm số lượng tế bào *V. parahaemolyticus* trong môi trường có màng vi tảo (phương pháp cùng nuôi) so với trong môi trường không có màng vi tảo. Kết quả cho thấy, vật liệu xơ dừa và vải thưa có mật độ bao phủ và chứa hàm lượng sinh khối vi tảo, sau 72 giờ tạo màng, cao hơn vật liệu bã mía. Bên cạnh đó, màng vi tảo được hình thành bởi tổ hợp của chủng vi khuẩn lam NK1111 với chủng vi tảo lục MBN1 hoặc MHN122 có khả năng ức chế 76,2% - 99,8% khuẩn *V. parahaemolyticus* trong khoảng thời gian từ 96 giờ đến 120 giờ thử nghiệm. Trong khi đó, màng vi tảo được hình thành từ chủng vi khuẩn lam NK1111 và chủng vi tảo lục MHB231 có khả năng ức chế 91,8% vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ngay từ thời điểm 24 giờ và ức chế 99,4% vi khuẩn này ở thời điểm 120 giờ thử nghiệm. Chính vì vậy, màng vi tảo NK1111 + MHB231 trên hai loại giá thể vải thưa hoặc giá thể xơ dừa được đánh giá là có tiềm năng ứng dụng cao trong các trang trại nuôi tôm ở Việt Nam.

Từ khóa: Màng sinh học tự dưỡng, Phương pháp cùng nuôi cấy, Ức chế vi khuẩn, *Vibrio parahaemolyticus*, Vi khuẩn lam, Vi tảo.

1. Mở đầu

Vi tảo là nhóm sinh quang tự dưỡng được đánh giá là có năng suất sinh học lớn nhất trong sinh giới [1]. Sinh khối của vi tảo có chứa các loại amino acid thiết yếu, các dạng lipid có lợi, carbohydrate, cùng đầy đủ các vitamin và sắc tố

[2]. Chính vì thế, vi tảo được coi là một nguồn thức ăn có hàm lượng dinh dưỡng cao lại an toàn cho con người và các động vật thủy sản (cá, tôm,...) [3]. Do có khả năng sinh trưởng nhanh trong các môi trường nước mặn, nước lợ và nước ngọt nên chúng trở thành một nguồn dinh dưỡng thường xuyên, không bao giờ cạn kiệt ngay trong môi trường sống của các động vật thủy sản. Bên cạnh vai trò là nguồn thức ăn, nhiều nghiên cứu còn chứng minh vi tảo có khả năng làm sạch nước nuôi bằng cách loại bỏ 74,8

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: luonghang@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5751>

- 86,1% nitrogen tổng và 82,7% - 92,2% phospho tổng trong nước thải của ao nuôi tôm [3, 4], đồng thời chúng có khả năng ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. lentus*, *V. alginolyticus*,... gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản [5]. Vi tảo có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh thủy sản khi sử dụng ở dạng tế bào sống hoặc ở dạng dịch chiết [6]. Chính vì thế, vi tảo được sử dụng như một nhóm vi sinh vật có lợi làm tác nhân kiểm soát cân bằng sinh học, ức chế các vi sinh vật gây bệnh trong các hồ nuôi [7].

V. parahaemolyticus là loài vi khuẩn xuất hiện phổ biến trong các ao/hồ nuôi tôm, và là tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm [8]. Vì vậy, *V. parahaemolyticus* được coi là sinh vật đích cho các nghiên cứu đánh giá khả năng ức chế bởi các vi tảo lục như *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum*, *Dunaliella tertiolecta*,... [2, 9]. Trong một nghiên cứu trước, chúng tôi cũng đã phát hiện được chủng vi khuẩn lam NK1111 có khả năng sản sinh hợp chất ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, đồng thời chủng này cũng làm giảm 94,0% - 95,6% nồng độ của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sau 72 - 96 giờ cùng nuôi [10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục phát triển một cấu trúc màng sinh học tự dưỡng được hình thành từ chủng vi khuẩn lam NK1111 với các chủng vi tảo lục có giá trị dinh dưỡng cao (28,5% - 29,4% protein, 15,5% - 20,7% carbohydrate, 12,0% - 25,0% lipid - số liệu chưa công bố) nhằm mục đích phát huy tiềm năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bởi các chủng vi tảo. Các chủng vi tảo sử dụng trong nghiên cứu đều có nguồn gốc từ các thủy vực ở Việt Nam, do đó, màng vi tảo có thể dễ dàng thích nghi và phát triển trong các ao/hồ nuôi tôm, đem lại lợi ích cho ngành nuôi trồng thủy sản nội địa.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

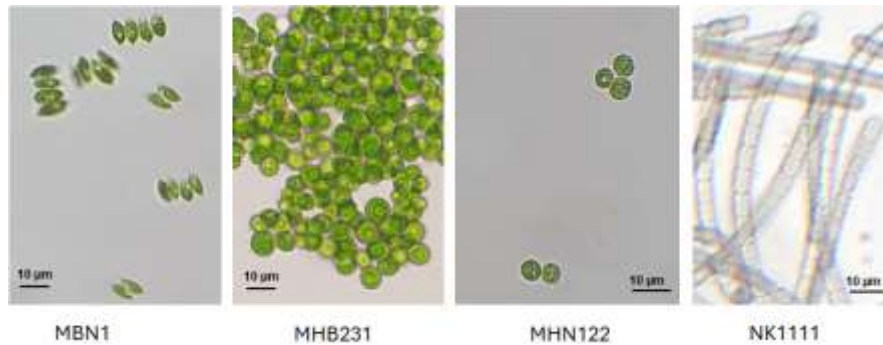
2.1. Các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu

Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802 được đặt từ hãng ThermoFisher Scientific (Hoa Kỳ) và được nuôi trong môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS - Merck, Đức) hoặc

môi trường Luria-Bertani (LB-ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ) chứa NaCl 3%. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng một chủng vi khuẩn lam (NK1111) và ba chủng vi tảo lục (MHN122, MBN1 và MHB231) để tạo màng sinh học tự dưỡng (màng vi tảo). Hình thái của bốn chủng vi tảo trong nghiên cứu được thể hiện ở Hình 1. Trong đó, chủng vi khuẩn lam NK1111 thuộc họ Nostocaceae Eichler [11], chủng vi tảo lục MHN122 thuộc họ Protosiphonaceae Blackman & Tansley [11], hai chủng MBN1 và MHB231 cùng thuộc họ Scenedesmeaceae Oltmanns [11]. Bốn chủng vi tảo này được phân lập từ đất ruộng ở Bắc Ninh, Hà Nội và Hòa Bình và được lưu giữ trong môi trường dinh dưỡng Blue - Green medium (BG11) tại phòng thí nghiệm Bộ môn Chuyên Sinh, Trường Trung học phổ thông Chuyên Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội.

2.2. Phương pháp tạo màng vi tảo

Ba loại vật liệu dễ phân hủy là vải thưa, xơ dừa và bã mía được sử dụng để làm giá thể cho vi tảo. Mỗi loại vật liệu được rửa sạch, hấp vô trùng và cắt thành miếng vuông có kích thước 2,0 cm², độ dày 1,0 - 2,0 mm và được ghi lại khối lượng của mỗi loại giá thể sau khi sấy khô. Quá trình tạo màng vi tảo được tiến hành theo hai giai đoạn, giai đoạn tạo biofilm cấp 1 trong 3 ngày đầu (chỉ có chủng vi khuẩn lam NK1111 bám vào bề mặt vật liệu) và giai đoạn tạo biofilm cấp 2 trong 3 ngày tiếp theo (có thêm sự bám dính của một trong ba chủng vi tảo lục MBN1, MHN122 hoặc MHB231). Mỗi loại màng vi tảo được hình thành từ sự kết hợp của chủng vi khuẩn lam (NK1111) với một chủng vi tảo lục (MBN1 hoặc MHB231 hoặc MHN122) trên một loại giá thể (vải thưa hoặc xơ dừa hoặc bã mía). Vì vậy, chín loại màng sinh học đã được tạo ra từ tổ hợp của chủng vi khuẩn lam NK1111 với ba chủng vi tảo lục (MHN122/MBN1/MHB231) trên ba loại giá thể khác nhau. Khả năng tạo màng sinh học tự dưỡng bởi sự kết hợp của hai chủng vi tảo và sinh khối khô của màng vi tảo được ghi nhận sau 6 ngày thí nghiệm.



Hình 1. Hình thái của bốn chủng vi tảo trong nghiên cứu.

2.3. Đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng của màng vi tảo đối với *V. parahaemolyticus*

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng của màng vi tảo đối với *V. parahaemolyticus* được thực hiện theo công bố của Nguyễn Văn Kiên và cộng sự [10] với một cải tiến nhỏ. Trong đó, màng sinh học tự dưỡng chứa chủng vi khuẩn lam NK1111 và một trong 3 chủng vi tảo lục (MBN1 hoặc MHN122 hoặc MHB231) được sử dụng thay thế 5 mL cận sinh khối tươi của chủng NK1111 (đã ly tâm để loại dịch nuôi cấy). Mỗi tổ hợp màng vi tảo của chủng NK1111 với một chủng vi tảo lục được bố trí thành 6 lô thí nghiệm như sau:

Nghiệm thức 1-XD: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 màng vi tảo trên giá thể xơ dừa.

Nghiệm thức 2-XD: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 giá thể xơ dừa.

Nghiệm thức 3-XD: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + 10 màng vi tảo trên giá thể xơ dừa.

Nghiệm thức 1-VT: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 màng vi tảo trên giá thể vải thưa.

Nghiệm thức 2-VT: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 giá thể vải thưa.

Nghiệm thức 3-VT: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + 10 màng vi tảo trên giá thể vải thưa.

Trong đó, nồng độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được bổ sung vào mỗi nghiệm thức được tính toán để tương đương với 10^4 CFU/mL. Thí nghiệm với mỗi loại màng sinh học tự dưỡng được lặp lại 3 lần và tỷ lệ ức chế sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* gây ra bởi mỗi loại màng này tại các thời điểm thu mẫu (24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ) được xác định theo công thức:

Tỷ lệ ức chế (%) = $(1 - \text{CFU mẫu nghiệm thức 1} / \text{CFU mẫu nghiệm thức 2}) \times 100\%$

2.4. Phương pháp xử lý thống kê

Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel (Microsoft, USA) phiên bản 2016, với các hàm số TTEST, AVERAGE và STDEV.S.

3. Kết quả

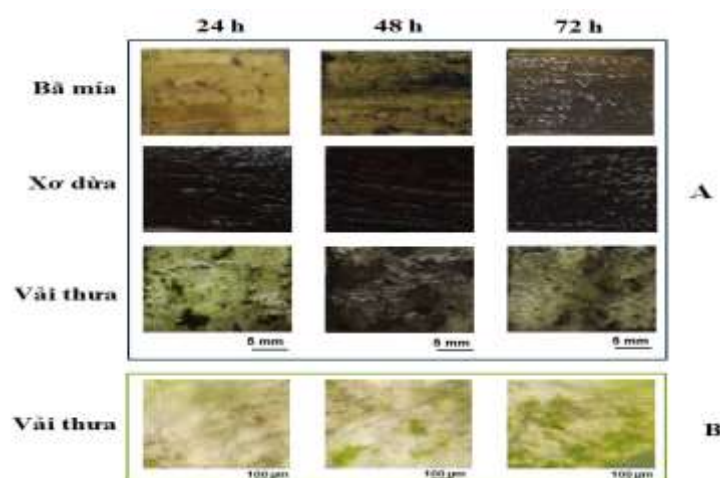
3.1. Kết quả sự tạo màng vi tảo

Kết quả ghi nhận sau 6 ngày tạo màng vi tảo cho thấy, cả ba loại giá thể đều có sự bám dính của các chủng vi khuẩn lam và vi tảo lục từ thời điểm 24 giờ đến 72 giờ (Hình 2). Trong đó, giá thể xơ dừa và vải thưa có mật độ cư trú của vi tảo nhiều hơn so với giá thể bã mía (Hình 2A). Mật độ của hai chủng vi tảo cũng tăng lên tương ứng từ 24 giờ đến 72 giờ khi được quan sát dưới kính hiển vi quang học (Hình 2B). Mặt khác, kết quả về sinh khối khô của hỗn hợp vi khuẩn lam và vi tảo lục cũng đã chứng minh khả năng bám dính tốt nhất của hai loại vi tảo này là trên giá thể vải thưa, sau đó là giá thể xơ dừa và cuối cùng là giá thể bã mía với hàm

lượng sinh khối lần lượt là $3,6 \pm 0,4$ mg/màng, $2,8 \pm 0,6$ mg/màng và $1,2 \pm 0,2$ mg/màng.

Hiện nay, so với việc sử dụng vi tảo ở dạng tự do trong các lĩnh vực sản xuất thức ăn dinh dưỡng, sản xuất nhiên liệu, loại bỏ vi sinh vật trong nuôi trồng thủy sản và xử lý nước thải, thì màng vi tảo được đánh giá cao hơn bởi sở hữu nhiều đặc tính ưu việt như dễ thu hoạch, khả năng thu hồi sinh khối cao hơn và tiêu thụ nước ít hơn [12]. Vi tảo có ưu thế trong việc tạo màng sinh học so với các nhóm sinh vật khác

do có nhiều protein và carbohydrate ở bề mặt tế bào giúp chúng dễ dàng bám dính vào bề mặt vật liệu mang [13]. Vật liệu được sử dụng để làm giá thể cho vi tảo rất đa dạng có thể sử dụng các vật liệu tự nhiên (gỗ, sợi bông, mùn cưa) hoặc vật liệu tổng hợp (polyester, nylon) [12]. Theo Venable và cộng sự [14] vật liệu mang phải duy trì được sự nguyên vẹn và không bị biến đổi bởi nhiệt độ, tia UV và hoạt động sống của vi sinh vật.



Hình 2. Màng sinh học tự dưỡng được hình thành từ chủng vi khuẩn lam NK1111 và chủng vi tảo BMN1
A: Biofilm cấp 2 trên ba loại giá thể được chụp bằng camera thường ở các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ;
B: Biofilm cấp 2 được hình thành trên giá thể vải thưa được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ; h: giờ.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng ba loại vật liệu tự nhiên là vải thưa, xơ dừa và bã mía vừa đảm bảo độ bền trong quá trình sử dụng lại vừa có thể loại bỏ ra khỏi các ao nuôi khi mật độ vi tảo tăng cao. Trong đó, giá thể vải thưa và xơ dừa cho kết quả bám dính của vi tảo nhanh hơn, thể hiện ở lượng sinh khối vi tảo từ 2,8 đến 3,6 mg/màng. Việc phát hiện xơ dừa có thể được sử dụng làm giá thể cho vi tảo là một sáng kiến độc đáo giúp tận dụng được nguồn phế thải sinh hoạt hàng ngày ở Việt Nam nhưng vẫn đảm bảo bảo được hiệu quả của việc sản xuất màng vi tảo.

Màng vi tảo có thể được tạo ra từ một chủng vi tảo đơn lẻ hoặc kết hợp nhiều chủng vi tảo trên cùng một giá thể. Nghiên cứu này đã sử dụng hai loại vi tảo khác nhau là vi khuẩn lam

và vi tảo lục nhằm tận dụng khả năng bám dính tốt của chủng vi khuẩn lam NK1111 vào bề mặt vật liệu do có dạng sợi dài, có bao nhày polysaccharide và chủng vi tảo đơn bào (MHN122 hoặc MBH231) có khả năng lấp đầy và làm dày bề mặt giá thể sau khi có sự định cư của chủng vi khuẩn lam.

3.2. Khả năng ức chế của màng vi tảo đối với *V. parahaemolyticus*

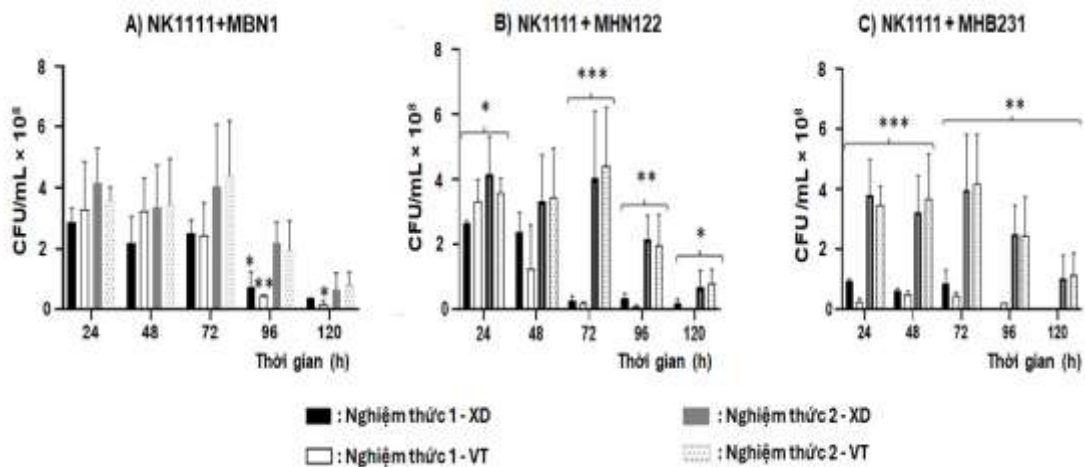
Do khả năng bám dính tốt của các chủng vi tảo trên hai loại giá thể vải thưa và xơ dừa so với giá thể bã mía nên trong thí nghiệm này chúng tôi chỉ lựa chọn các màng vi tảo hình thành trên giá thể vải thưa và xơ dừa để đánh giá khả năng ức chế đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (sau đây gọi tắt là vi

khuẩn *Vp*). Số liệu về đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU/mL) của vi khuẩn *Vp* trong các bình nuôi có một trong ba loại màng vi tảo (NK1111 + MBN1, NK1111 + MHN122, NK1111 + MHN231) trên giá thể vải thưa hoặc xơ dừa và trong các bình nuôi đối chứng (chỉ có giá thể vải thưa hoặc xơ dừa) được minh họa ở Hình 3. Mật độ khuẩn lạc *Vp* ở các thời điểm 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ trong hai nghiệm thức 1-VT và 2-VT được minh họa ở Hình 4.

Kết quả cho thấy, trong các bình nuôi không có màng vi tảo, số đơn vị hình thành khuẩn lạc của vi khuẩn *Vp* tăng nhẹ từ thời điểm 24 giờ đến 72 giờ (từ $3,3 \times 10^8$ CFU/mL đến $4,1 \times 10^8$ CFU/mL) và đều giảm ở các nghiệm thức 2 - XD và nghiệm thức 2 - VT sau thời điểm 72 giờ (từ $4,1 \times 10^8$ xuống thấp nhất là $6,6 \times 10^7$) (Hình 3A - C). Trong các bình nuôi có màng vi tảo, nồng độ vi khuẩn *Vp* giảm rõ rệt từ thời điểm 24 giờ đến 120 giờ. Nồng độ *Vp* giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ hoặc $p < 0,01$) từ thời điểm từ 96 giờ đến 120 giờ

trong các bình nuôi có màng vi tảo NK1111 + MBN1. Cụ thể, nồng độ vi khuẩn *Vp* chỉ còn $4,3 \times 10^7$ CFU/mL so với $19,4 \times 10^7$ CFU/mL trong mẫu đối chứng ở thời điểm 96 giờ và chỉ còn $1,8 \times 10^7$ CFU/mL so với $7,9 \times 10^7$ CFU/mL trong mẫu đối chứng ở thời điểm 120 giờ (Hình 3A).

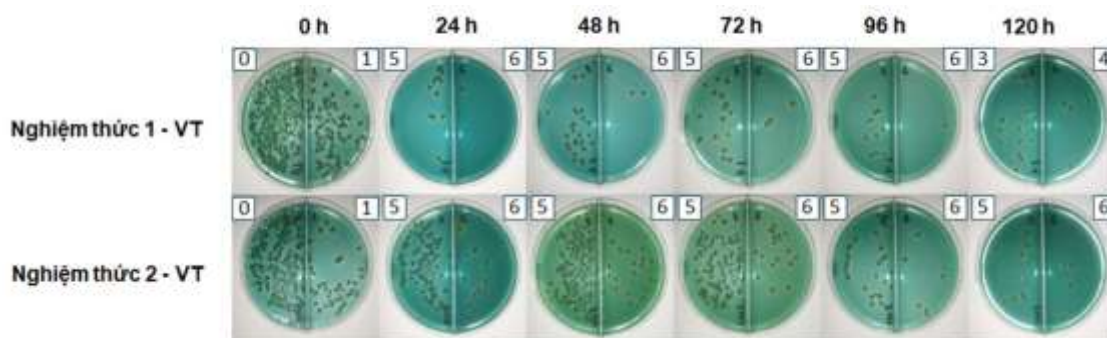
Với màng vi tảo NK1111 + MHN231 hoặc NK1111 + MHN122, số đơn vị hình thành khuẩn lạc của vi khuẩn *Vp* có xu hướng giảm trong khoảng thời gian từ 24 giờ đến 120 giờ cùng nuôi trong bình. Nồng độ vi khuẩn *Vp* chỉ còn $7,3 \times 10^4$ CFU/mL khi được cùng nuôi với màng vi tảo NK1111 + MHN122 trong khoảng thời gian sau 120 giờ, trong khi chúng đạt tới $1,8 \times 10^8$ CFU/mL trong các bình nuôi không có màng vi tảo NK1111 + MHN122 ở cùng thời gian này (Hình 3B). Khi được cùng nuôi với màng vi tảo NK1111 + MHN231, nồng độ vi khuẩn *Vp* giảm còn $1,4 \times 10^2$ CFU/mL so với với nồng độ $6,6 \times 10^7$ CFU/mL ở mẫu đối chứng sau 120 giờ cùng nuôi (Hình 3C).



Hình 3. Nồng độ *V. parahaemolyticus* từ dịch nuôi tại 5 thời điểm thí nghiệm .

- Nghiệm thức 1-XD: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 màng vi tảo trên giá thể xơ dừa.
- Nghiệm thức 2-XD: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 giá thể xơ dừa.
- Nghiệm thức 1-VT: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 màng vi tảo trên giá thể vải thưa.
- Nghiệm thức 2-VT: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3% + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 giá thể vải thưa.

Với *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; CFU (Colony form units): đơn vị hình thành khuẩn lạc; h: giờ.



Hình 4. Mật độ khuẩn lạc *V. parahaemolyticus* từ dịch nuôi của 3 nghiệm thức thu tại 5 thời điểm thí nghiệm.

Nghiệm thức 1-VT: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3%
 + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 màng vi tảo trên giá thể vải thưa.
 Nghiệm thức 2-VT: 45 mL BG11 NaCl 3% + 2,5 mL LB NaCl 3%
 + *V. parahaemolyticus* (10^4 CFU/mL) + 10 giá thể vải thưa.

[0, 1, 3-6]: là hệ số pha loãng của dịch nuôi từ mỗi nghiệm thức tương ứng với 0; 10^1 ; 10^3 ; 10^4 ; 10^5 ; 10^6 trước khi được cấy trải lên môi trường TCBS; CFU (Colony form units): đơn vị hình thành khuẩn lạc; BG11: Môi trường nuôi vi tảo; LB (Luria Bertani): Môi trường nuôi vi khuẩn; h: giờ.

Các số liệu về sự giảm số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của vi khuẩn *Vp* trong các bình nuôi có màng vi tảo so với các bình nuôi chỉ có giá thể xơ dừa/vải thưa chứng tỏ màng vi tảo có khả năng ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn *Vp*. Kết quả minh họa ở Hình 3A – C cũng cho thấy sự khác nhau về khả năng ức chế của màng vi tảo được hình thành trên giá thể vải thưa và xơ dừa là không có ý nghĩa thống kê, chứng tỏ hai loại vật liệu này đều thích hợp với vai trò làm giá thể cho màng vi tảo. Tỷ lệ ức chế của màng vi tảo trên giá thể vải thưa đối với vi khuẩn *Vp* ở các thời điểm từ 24 giờ đến 120 giờ được minh họa ở Hình 5. Rõ ràng, sự ức chế 76,2% - 99,8% vi khuẩn *Vp* bởi hai màng NK1111 + MBN1 và NK1111 + MHN122 chỉ thể hiện từ thời điểm 96 giờ, trong khi đó màng vi tảo NK1111 + MHB231 có khả năng ức chế 91,8% vi khuẩn *Vp* ngay từ thời điểm 24 giờ và ức chế 99,4% vi khuẩn *Vp* ở thời điểm 120 giờ cùng nuôi. Chính vì vậy, màng vi tảo NK1111 + MHB231 được đánh giá là có tiềm năng ứng dụng cao trong việc ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn *Vp*.

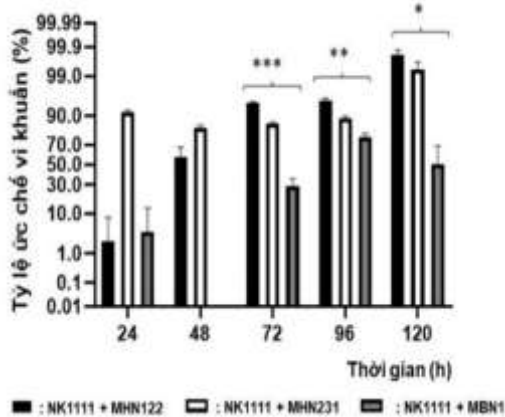
Mặt khác, từ kết quả CFU/mL vi khuẩn *Vp* giảm ở tất cả các nghiệm thức không có màng vi tảo (nghiệm thức 2-XD và 2-VT) sau thời điểm 72 giờ, chứng tỏ, khả năng sinh trưởng

của vi khuẩn *Vp* còn bị ảnh hưởng bởi môi trường nuôi (Hình 3A–C). Sau 72 giờ, lượng 2,5 mL dinh dưỡng LB đã bị tiêu thụ nên môi trường sống không còn thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn *Vp*. Điều này có thể liên hệ với thực tế là không phải các bể nuôi tôm nào cũng thuận lợi cho sự sinh trưởng của vi khuẩn *Vp* và gây nên sự bùng phát của dịch bệnh.

Trong nghiên cứu này, loại màng sinh học tự dưỡng được hình thành từ tổ hợp chủng NK1111 + MBN1 cũng như loại màng được hình thành từ tổ hợp chủng NK1111 + MHN122 chỉ có khả năng ức chế vi khuẩn *Vp* sau thời điểm sau 72 giờ cùng nuôi, tức là khi điều kiện môi trường sống bị hạn chế về dinh dưỡng. Trong khi đó, loại màng sinh học tự dưỡng được hình thành từ tổ hợp chủng NK1111 + MHN231 có khả năng ức chế 83,1% - 91,8% vi khuẩn *Vp* ngay từ thời điểm 24 - 48 giờ và khả năng ức chế này tăng lên đến 99,4% sau 120 giờ thử nghiệm (Hình 5). Điều này chứng tỏ màng sinh học tự dưỡng được tạo thành bởi chủng vi khuẩn lam NK1111 và chủng vi tảo lục MHN231 có khả năng ức chế mạnh vi khuẩn *Vp* ngay cả khi môi trường sống đang thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn này.

Kết quả ức chế 99,4% vi khuẩn *Vp* của màng vi tảo NK1111 + MHN231 có thể so sánh được với khả năng ức chế 99,9% *Vp* của vi tảo *Spirulina platensis* trong nghiên cứu của Kokou và cộng sự [5]. Mặt khác, màng vi tảo NK1111 + MHN231 được tạo ra trong nghiên cứu này có tính ứng dụng cao hơn do dễ dàng sinh trưởng trong các ao nuôi tôm mà không cần phải sống trong điều kiện pH cao (trong khoảng 9 đến 10) như tảo xoắn *Spirulina platensis*.

Như chúng tôi đã đề cập trong nghiên cứu trước [10], tác dụng ức chế vi khuẩn *Vp* bởi vi tảo là sự đối kháng sinh học có thể được giải thích theo hai cơ chế: i) Sự hấp phụ tế bào vi khuẩn *Vp* vào bao nhày bao quanh các tế bào vi tảo [15] hoặc ii) Sự sản sinh các hợp chất kháng khuẩn bởi chủng vi khuẩn lam NK1111 [10]. Trong nghiên cứu này, các màng vi tảo đã được nuôi ổn định trong thời gian hai tuần trước khi bổ sung vi khuẩn *Vp* để tạo điều kiện cho các chủng vi tảo sinh trưởng và tổng hợp các hợp chất hấp phụ hoặc ức chế cần thiết ra môi trường sống. Tổ hợp các chủng vi tảo khác nhau trong màng sinh học tự dưỡng có thể tạo ra sự cảm ứng sinh tổng hợp các hợp chất sơ cấp và thứ cấp khác nhau [16], điều này giải thích cho tác dụng làm giảm nồng độ vi khuẩn *Vp* một cách ưu việt hơn của màng vi tảo NK1111 + MHN231 so với màng vi tảo NK1111 + MBN1 và NK1111 + MHN122.



Hình 5. Tỷ lệ ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của ba loại màng vi tảo trên giá thể vải thưa
*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã tạo được các màng sinh học tự dưỡng bằng cách gắn một chủng vi khuẩn lam và một chủng vi tảo lục lên vật liệu xơ dừa hoặc vải thưa. Màng vi tảo NK1111 + MHN231 có khả năng ức chế 99,4% vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sau 120 giờ cùng nuôi. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng ở quy mô lớn nhằm đưa màng vi tảo NK1111 + MHN231 vào môi trường nuôi trồng thủy sản vừa giúp giảm sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (gây bệnh hoại tử gan tụy cấp) vừa cung cấp thức ăn dinh dưỡng cho tôm trong các ao nuôi.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02 - 2019.336.

Tài liệu tham khảo

- [1] M. Rizwan, G. Mujtaba, S. A. Memon, K. Lee, N. Rashid, Exploring the Potential of Microalgae for New Biotechnology Applications and Beyond: a Review, *Renew. Sustain. Energy Rev*, Vol. 92, 2018, pp. 394-404.
- [2] S. Nagappan, P. Das, M. AbdulQuadir, M. Thaher, S. Khan, C. Mahata, H. A. Jabri, A. K. Vatland, G. Kumar, Potential of Microalgae as a Sustainable Feed Ingredient for Aquaculture, *J. Biotechnol*, Vol. 341, 2021, pp. 1-20.
- [3] A. Ahmad, S. W. Hassan, F. Banat, An Overview of Microalgae Biomass as a Sustainable Aquaculture Feed Ingredient: Food Security and Circular Economy, *Bioengineered*, Vol. 13, 2022, pp. 9521-9547.
- [4] N. M. Jais, R. Mohamed, W. A. W. Apandi, H. Peralta, Removal of Nutrients and Selected Heavy Metals in Wet Market Wastewater by Using Microalgae *Scenedesmus* sp., *Appl. Mech. Mater*, Vol. 773, 2015, pp. 1210-1214.
- [5] F. Kokou, P. Makridis, M. Kentouri, P. Divanach, Antibacterial Activity in Microalgae Cultures, *Aquac. Res*, Vol. 43, 2012, pp. 1520-1527.
- [6] Z. Yaakob, E. Ali, A. Zainal, M. Mohamad, M. S. Takriff, An Overview: Biomolecules from Microalgae for Animal Feed and Aquaculture, *J. Biol. Res. (Thessaloniki)*, Vol. 21, 2014, pp. 1-10.

- [7] P. Charoonnart, S. Purton, V. Saksmerprom, Applications of Microalgal Biotechnology for Disease Control in Aquaculture, *Biol*, Vol. 7, 2018, pp. 24-30.
- [8] L. Tran, L. Nunan, R. M. Redman, L. L. Mohny, C. R. Pantoja, K. Fitzsimmons, D. V. Lightner, Determination of the Infectious Nature of the Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome Affecting Penaid Shrimp. *Dis. Aquat. Organ*, Vol. 105, 2013, pp. 45-55.
- [9] M. Naviner, J. P. Bergé, P. Durand, H. L. Bris, Antibacterial Activity of the Marine Diatom *Skeletonema costatum* Against Aquacultural Pathogens, *Aquac*, Vol. 174, 1999, pp. 15-24.
- [10] V. K. Nguyen, Q. C. Truong, T. T. Ngo, T. N. Nguyen, V. K. Le, T. L. H. Pham, Study on Antibacterial Activities against *Vibrio parahaemolyticus* by Several Cyanobacterial Strains, Proceedings of Vietnam National Conference in Biotechnology, Dak Lak Province 2022, Publishing House for Science and Technology, 2022, pp. 1729-1734.
- [11] M. D. Guiry, M. D., Guiry, G. M. December 5, 2016M AlgaeBase, World-wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway., <https://www.algaebase.org>; (accessed on: June 01st, 2024).
- [12] Q. Zhang, C. Liu, Y. Li, Z. Yu, Z. Chen, T. Ye, X. Wang, Z. Hu, S. Liu, B. Xiao, S. Jin, Cultivation of Algal Biofilm Using Different Lignocellulosic Materials as Carriers, *Biotechnol. Biofuels*, Vol. 10, 2017, pp. 115-131.
- [13] A. Lee, D. Lewis, P. Ashman, Force and Energy Requirement for Microalgal Cell Disruption: An Atomic Force Microscope Analysis, *Bioresour. Technol*, Vol. 128, 2013, pp. 199-206.
- [14] M. E. Venable, M. R. Podbielski, Impact of Substrate Material on Algal Biofilm Biomass Growth, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*, Vol. 26, 2019, pp. 7256-7262.
- [15] P. Rajendran, P. A. Subramani, D. Michael, Polysaccharides from Marine Macroalga, *Padina gymnospora* Improve the Nonspecific and Specific Immune Responses of *Cyprinus carpio* and Protect it from Different Pathogens, *Fish Shellfish Immunol*, Vol. 58, 2016, pp. 220-228.
- [16] L. Wang, H. Xiao, N. He, D. Sun, S. Duan, Biosorption and Biodegradation of the Environmental Hormone Nonylphenol by Four Marine Microalgae, *Sci. Rep*, Vol. 9, 2019, pp. 5277-5789.