

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Hương Giang

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN CÓ LỢI
SINH TRƯỞNG TRONG MÔI TRƯỜNG CHỨA TẢO**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Hương Giang

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN CÓ
LỢI SINH TRƯỞNG TRONG MÔI TRƯỜNG CHỨA TẢO**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Hoàng Phương Hà 

2. TS. Chu Nhật Huy 

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài trong luận văn này là kết quả của quá trình nghiên cứu do chính tôi thực hiện, dựa trên các tài liệu và số liệu mà tôi đã tự tìm hiểu và phân tích. Kết quả nghiên cứu đảm bảo tính trung thực và khách quan, đồng thời chưa từng được công bố trong bất kỳ nghiên cứu nào trước đây. Tôi cam kết rằng mọi số liệu và kết quả trong luận văn là trung thực, nếu sai tôi xin chịu trách nhiệm.

Hà Nội, ngày 19 tháng 11 năm 2024

Tác giả luận văn



Bùi Hương Giang

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, em xin gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, các thầy cô giáo thuộc Khoa Công nghệ Sinh học, Phòng Đào tạo, Quản lý Khoa học và Hợp tác quốc tế của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã truyền đạt kiến thức và tạo điều kiện thuận lợi giúp đỡ em trong suốt quá trình học tập tại Học viện.

Em xin gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo viện Công nghệ sinh học và lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Hoàng Phương Hà và TS. Chu Nhật Huy là các giảng viên hướng dẫn đã tận tình chỉ dạy, đưa ra nhận xét, góp ý giúp em hoàn thành các công việc nghiên cứu và trưởng thành trong cuộc sống.

Em xin chân thành cảm ơn toàn thể các anh chị em đồng nghiệp trong Phòng CNSH Tái tạo môi trường - Viện Công nghệ Sinh học đã hỗ trợ và giúp đỡ em trong thời gian học tập và thực hiện luận văn này. Đặc biệt, em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ths. NCS. Nguyễn Thị Minh đã luôn quan tâm giúp đỡ và tận tình chỉ bảo chi tiết các nội dung công việc trong suốt quá trình thực hiện luận văn.

Cuối cùng, em xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, người thân đã luôn động viên và giúp đỡ để em đạt được kết quả này.

Hà Nội, ngày 19 tháng 11 năm 2024

Tác giả luận văn



Bùi Hương Giang

MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG.....	v
DANH MỤC HÌNH.....	vi
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT.....	vii
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Tình hình nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam.....	4
1.2. Tổng quan về probiotic ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản.....	5
1.3. Tổng quan về tảo.....	9
1.4. Lên men vi sinh vật có lợi trong môi trường chứa tảo.....	14
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	18
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	18
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	19
2.2.1. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzym ngoại bào, kháng vi khuẩn gây bệnh <i>V. parahaemolyticus</i>	19
2.2.2. Sàng lọc loài tảo khô làm môi trường lên men vi khuẩn có lợi.....	19
2.2.3. Đánh giá hoạt tính enzym ngoại bào.....	20
2.2.4. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh <i>V. parahaemolyticus</i>	20
2.2.5. Xác định hàm lượng axit lactic trong môi trường.....	21
2.2.6. Đánh giá khả năng tồn tại của vi khuẩn tuyển chọn trong một số điều kiện cực trị [61].....	21
2.2.7. Phương pháp xác định chỉ số prebiotic.....	22
2.2.9. Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn.....	23
2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu.....	23
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	24
3.1. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh các enzym ngoại bào, kháng vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> gây bệnh đường ruột trên tôm thẻ chân trắng.	24
3.1.1. Quan sát đặc điểm hình thái.....	24
3.1.2. Đánh giá hoạt tính sinh enzym ngoại bào và ức chế vi khuẩn gây bệnh <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.....	25
3.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu trong môi trường chứa tảo.	26
3.2.1. Ảnh hưởng của loại tảo và nồng độ tảo đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn nghiên cứu.	26
3.2.2. Ảnh hưởng của môi trường chứa tảo đến hoạt tính sinh enzym ngoại bào và ức chế vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.....	30

3.3. Định danh các chủng vi khuẩn lựa chọn	34
3.4. Đánh giá đặc tính sinh học của chủng vi khuẩn <i>L. acidophilus</i> LB trong môi trường MRS và môi trường chứa tảo.	35
3.5. Đánh giá khả năng chịu đựng của vi khuẩn có lợi lựa chọn khi sinh trưởng trong môi trường chứa tảo ở một số điều kiện cực trị (độ mặn, nhiệt độ, pH)	40
3.5.1. Ảnh hưởng của nồng độ muối.....	40
3.5.2. Ảnh hưởng của sốc nhiệt.....	41
3.5.3. Ảnh hưởng của pH	43
3.6. Đánh giá khả năng sử dụng prebiotic từ tảo <i>S. platensis</i>	44
3.6.1. Xác định chỉ số prebiotic.....	45
3.6.2. Xác định chỉ số hoạt động prebiotic.....	46
3.7. Hàm lượng axit béo của sinh khối tảo sau khi lên men với <i>L. acidophilus</i> LB.	46
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	49
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	48

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1: Đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn nghiên cứu.....	24
Bảng 3.2: Hoạt tính sinh enzym ngoại bào và ức chế vi khuẩn <i>V.parahaemolyticus</i> của các chủng nghiên cứu	25
Bảng 3.3: Hoạt tính sinh học của chủng P1 trong các môi trường.....	30
Bảng 3.4: Hoạt tính sinh học của chủng P2 trong các môi trường.....	31
Bảng 3.5: Hoạt tính sinh học của chủng P3 trong các môi trường.....	33
Bảng 3.6: Hoạt tính sinh học của chủng P4 trong các môi trường.....	33
Bảng 3.7: Mật độ vi khuẩn <i>L. acidophilus</i> trong môi trường nuôi cấy bổ sung các loại và nồng độ sinh khối tảo khô khác nhau (Log CFU/mL)	36
Bảng 3.8: Hàm lượng axit lactic tạo thành của <i>L. acidophilus</i> LB trong môi trường nuôi cấy bổ sung các loại và nồng độ sinh khối tảo khô khác nhau (mg/mL).....	38
Bảng 3.9: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của <i>B. subtilis</i> P2.....	43
Bảng 3. 10: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của <i>Bacillus</i> sp. P4.....	43
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tồn tại của <i>L.acidophilus</i> LB	44
Bảng 3. 12: Thành phần axit béo (% trên TFA) trong hỗn hợp lên men của <i>L. acidophilus</i> LB và <i>S. platensis</i>	47

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Tảo <i>Isochrysis galbana</i> [34]	11
Hình 1.2: Tảo <i>Nannochloropsis oculata</i> [38]	12
Hình 1.3: Tảo <i>Spirulina platensis</i> [39].....	12
Hình 3.1: Vòng hoạt tính của các chủng vi khuẩn nghiên cứu	26
Hình 3.2: Mật độ vi khuẩn của chủng P1 sinh trưởng trong các môi trường tảo.....	27
Hình 3.3: Mật độ vi khuẩn của chủng P2 sinh trưởng trong các môi trường tảo.....	28
Hình 3.4: Mật độ vi khuẩn của chủng P3 sinh trưởng trong các môi trường tảo.....	28
Hình 3.5: Mật độ vi khuẩn của chủng P4 sinh trưởng trong các môi trường tảo.....	29
Hình 3.6: Hoạt tính sinh học của chủng P1 trong các môi trường.....	30
Hình 3.7: Hoạt tính sinh học của chủng P2 trong các môi trường	31
Hình 3.8: Hoạt tính sinh học của chủng P3 trong các môi trường tảo	33
Hình 3.9: Hoạt tính sinh học của chủng P4 trong các môi trường.....	34
Hình 3.10: Cây phát sinh loài của chủng P2 và P4	35
Hình 3.11: Ảnh hưởng của nguồn đường bổ sung đến hàm lượng axit lactic tạo thành trong các môi trường chứa sinh khối tảo.....	39
Hình 3.12: Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến các chủng <i>Bacillus</i>	40
Hình 3.13: Ảnh hưởng của các nồng độ NaCl đến sinh trưởng của chủng <i>L. acidophilus</i> LB	41
Hình 3.14: Ảnh hưởng của sốc nhiệt đến sinh trưởng của các chủng thuộc chi <i>Bacillus</i>	41
Hình 3.15: Ảnh hưởng của sốc nhiệt đến sinh trưởng của vi khuẩn <i>L. acidophilus</i> LB.....	42
Hình 3.16: Chỉ số prebiotic của vi khuẩn nghiên cứu sinh trưởng trong môi trường tảo <i>S. platensis</i>	45
Hình 3.17: Chỉ số hoạt động prebiotic của vi khuẩn nghiên cứu sinh trưởng trong môi trường chứa tảo <i>S. platensis</i>	46

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tên đầy đủ	Tên tiếng Việt
NTTS		Nuôi trồng thủy sản
SKK		Sinh khối khô
TSV	Taura Syndrome Virus	bệnh Taura
AHPND	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease	Bệnh hoại tử gan tụy cấp
EMS	Early Mortality Syndrome	Hội chứng chết sớm
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới
TFA	Total fatty acid	Tổng số axit béo
CFU	Colony forming units	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia
AXOS	arabinoxylan oligosaccharide	
MOS	mannan oligosaccharide	
GOS	galactooligosaccharide	
FOS	fructooligosaccharides	
PUFA	polyunsaturated fatty acid	
ARA	axit arachidonic	
DHA	Docosahexaemoic acid	
AA	Arachidonic acid	
EPA	Eicosapentaenoic	

MỞ ĐẦU

❖ Lý do chọn đề tài

Trong những năm gần đây, ngành nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là nuôi tôm, đã nổi lên như một lĩnh vực kinh tế chủ lực, đem lại giá trị cao và thu nhập ổn định cho người dân. Tuy nhiên, nó cũng đang phải đối mặt với nhiều thách thức lớn, bao gồm chi phí thức ăn cao, dịch bệnh, việc lạm dụng kháng sinh và hóa chất, cùng với vấn đề ô nhiễm môi trường. Để giải quyết những khó khăn này, việc bổ sung các sản phẩm sinh học có giá trị vào thức ăn cho động vật thủy sản không những giúp cung cấp đầy đủ dinh dưỡng, kích thích tăng trưởng và nâng cao sức đề kháng cho vật chủ mà còn tiết kiệm nguồn thức ăn, giảm thiểu ô nhiễm, an toàn vệ sinh thực phẩm đang trở thành hướng đi mới đầy triển vọng, được nhiều nông dân lựa chọn và cũng là tiêu chí của Chính phủ ta.

Probiotic là nhóm vi sinh vật có lợi, mang đến những cải thiện đáng kể cho sức khỏe vật nuôi bằng cách hỗ trợ chuyển hóa thức ăn và cạnh tranh hoặc ức chế vi khuẩn gây bệnh. Cùng với đó, tảo cũng được công nhận là nguồn nguyên liệu quý nhờ thành phần dinh dưỡng phong phú, không chỉ giúp chống oxy hóa, kháng viêm và kháng khuẩn, mà còn cung cấp sắc tố tự nhiên và các axit amin thiết yếu cho cả người và vật nuôi. Đặc biệt, một số loại polysaccharides từ tảo, như β -glucans từ *Chlorella vulgaris* và *Spirulina platensis*, đã được đề xuất là prebiotic tiềm năng.

Tảo và probiotic đã được sử dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản, nhưng thường chỉ được áp dụng một cách riêng rẽ. Điều này làm hạn chế hiệu quả của từng sản phẩm, do chưa có nhiều nghiên cứu đồng bộ. Một số nghiên cứu đã cho thấy việc sử dụng sinh khối tảo làm môi trường nuôi probiotic có thể cải thiện sự sinh trưởng, tồn tại và hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn. Đồng thời, sản phẩm từ quá trình lên men này vẫn giữ được các axit béo không bão hòa đa nổi bật như omega-3, omega-6, omega-7... có trong tảo, giúp hỗ trợ tiêu hóa và nâng cao giá trị dinh dưỡng cho vật nuôi.

Tại Việt Nam, nghiên cứu ứng dụng sinh khối tảo làm môi trường nuôi cấy vi khuẩn còn trong phạm vi hẹp, trong khi nhu cầu về các công nghệ lên men mới ngày càng cao từ phía cộng đồng khoa học và doanh nghiệp. Từ thực tế đó, đề tài "**Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của vi khuẩn có lợi sinh trưởng trong môi trường chứa tảo**" được thực hiện, với mục tiêu sàng lọc các chủng vi khuẩn và loại tảo phù hợp cho lên men, nhằm tạo ra một sản phẩm kết hợp hoạt tính sinh học quý của vi khuẩn và giá trị dinh dưỡng có trong tảo, giúp cải thiện sức khỏe vật nuôi và cung cấp thêm sản phẩm chăn nuôi giá trị sinh học, góp phần phát triển bền vững cho ngành thủy sản.

❖ **Mục đích nghiên cứu**

Lựa chọn được chủng lợi khuẩn có hoạt tính sinh học cao và có khả năng tồn tại trong các điều kiện cực trị khi sinh trưởng trong môi trường chứa tảo khô.

❖ **Nội dung nghiên cứu**

- (1) Sàng lọc một số chủng vi khuẩn có lợi có khả năng sinh các enzym ngoại bào, kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh đường ruột trên tôm thẻ chân trắng.
- (2) Sàng lọc một số loài tảo khô phù hợp làm môi trường lên men cho vi khuẩn lựa chọn.
- (3) Đánh giá khả năng chịu đựng của vi khuẩn lựa chọn khi sinh trưởng trên môi trường chứa tảo ở một số điều kiện cực trị (độ mặn, nhiệt độ, pH...).
- (4) Đánh giá khả năng sinh các enzym ngoại bào (amylase, protease, cellulase), kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của vi khuẩn sau khi lên men trong môi trường chứa tảo và khả năng sử dụng prebiotic từ tảo lựa chọn.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tình hình nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam

Trong quá trình nuôi tôm, do ảnh hưởng bởi biến đổi khí hậu, hoặc sử dụng nguồn gốc các chế phẩm sinh học chưa rõ ràng... đã làm cho môi trường nuôi bị ô nhiễm và hình thành các mầm bệnh, dịch bệnh gia tăng và diễn biến phức tạp. Một số bệnh phổ biến trên tôm như bệnh đốm trắng, bệnh Taura (Taura Syndrome Virus - TSV), đầu vàng, hoại tử cơ quan tạo máu, hoại tử cơ, hội chứng chết sớm, hội chứng hoại tử gan tụy cấp. Tất cả các bệnh này được phát hiện với nguyên nhân chủ yếu đều do vi khuẩn gây bệnh thuộc chi *Vibrio*, gây thiệt hại nghiêm trọng trên nhiều đối tượng thủy sản [1]. Trong đó, phổ biến nhất là chủng *V. parahaemolyticus* có khả năng ký sinh trong đường ruột vật chủ và tiết ra độc tố khiến gan sưng hoặc teo lại, gây chết tôm/cá hàng loạt từ 90 – 100% ao nuôi. *V. parahaemolyticus* được xem là tác nhân chính gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Nerosis Disease - AHPND), gây nên hội chứng chết sớm (Early Mortality Syndrome - EMS) trên tôm nuôi trong giai đoạn dưới 1 tháng tuổi, gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi tôm ở Việt Nam và trên thế giới do bệnh lý diễn ra nhanh chóng, nguyên nhân phức tạp và đặc điểm lan rộng của bệnh [2]. Để kiểm soát các vi khuẩn gây hại này, người ta thường sử dụng các loại kháng sinh như Tetracycline, Oxytetracycline, Rifamycine cùng với các hóa chất như Iodin, KMnO₄ [3]. Tuy nhiên, thói quen sử dụng và lạm dụng kháng sinh trong nuôi thủy sản đã dẫn đến những hệ lụy như kháng thuốc, tồn dư kháng sinh trong động vật thủy sản, trong môi trường nuôi gây ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe người tiêu dùng.

Bên cạnh vấn đề về kiểm soát dịch bệnh thì yếu tố về dinh dưỡng cũng là một trong những nguyên nhân quan trọng giúp đảm bảo năng suất thu hoạch. Mặc dù ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi đã đạt được những tiến bộ đáng kể để cung cấp sản phẩm chất lượng cao cho các trang trại, nhưng những chế độ ăn vẫn dựa trên các thành phần đa lượng có sẵn như cá, đậu tương, bột mì và dầu thực vật, được bổ sung bởi hỗn hợp vitamin và khoáng chất. Thực tế, thức ăn cho tôm chứa hàm lượng protein thô khoảng từ 25% - 40% cao hơn so với thức ăn được sử dụng cho gia súc và gia cầm [4]. Trước đây, bột cá là loại protein được lựa chọn phổ biến để bổ sung vào thức ăn nuôi thủy sản do chứa hàm lượng các chất dinh dưỡng cao và giúp kích thích sự thèm ăn của tôm, nhưng nguồn cung cấp bột cá trên thế giới từ việc đánh bắt ngoài tự nhiên đang bị suy giảm sản lượng, do vậy thúc đẩy việc tìm kiếm các nguyên liệu thay thế cho bột cá trong nuôi thủy sản [5].

1.2. Tổng quan về probiotic ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản

1.2.1. Định nghĩa probiotic

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), probiotic được định nghĩa là những vi sinh vật sống mà khi được cung cấp với lượng đủ, chúng có thể mang lại những lợi ích cho sức khỏe của người hoặc vật nuôi, bằng cách duy trì hoặc cải thiện sự cân bằng của hệ vi sinh đường ruột. Các vi sinh vật này thường là vi khuẩn lactic, *Bacillus* hay nấm men, ... Chúng được đề xuất như một liệu pháp bổ trợ vào chế độ ăn giúp chống lại các bệnh liên quan đến rối loạn tiêu hóa đường ruột đồng thời có thể cạnh tranh nơi ở và dinh dưỡng với vi khuẩn gây bệnh [6]. Probiotic được áp dụng như một phương pháp phòng ngừa, nhằm giảm nguy cơ mắc bệnh của vật chủ thay vì chỉ điều trị khi bệnh đã xảy ra.

Trong nuôi trồng thủy sản (NTTS), việc sử dụng probiotic ngày càng trở nên phổ biến bởi chúng đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong việc duy trì sức khỏe và sự phát triển của các loài thủy sản. Bổ sung probiotic vào môi trường nuôi trồng thủy sản giúp cải thiện chất lượng nước, tăng cường khả năng tiêu hóa và giảm nguy cơ mắc bệnh cho các loài thủy sản, giúp tạo ra một môi trường nuôi trồng hiệu quả và bền vững. Các vi sinh vật probiotic được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản bao gồm các chủng *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* và *Saccharomyces*, mỗi loại có những đặc điểm và lợi ích riêng biệt [7]. Như vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* có khả năng sản sinh các hợp chất kháng khuẩn tốt như axit lactic, hydrogen peroxide và bacteriocin, một số khác thuộc chi *Bacillus* hay nấm thì lại có khả năng sản sinh các enzym tiêu hóa và hoạt chất bacteriocin... Chúng có thể được dùng như các kháng sinh tự nhiên thay thế cho kháng sinh tổng hợp giúp ngăn ngừa sự bùng phát của vi khuẩn gây bệnh. Hơn nữa, tăng cường các lợi khuẩn trong đường ruột còn có tác dụng cải thiện quá trình tiêu hóa, hấp thụ dinh dưỡng và chuyển hóa thức ăn cho các động vật thủy sản.

1.2.2. Một số nhóm vi sinh vật probiotic

1.2.2.1 Vi khuẩn lactic: Chi *Lactobacillus*

Vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* là vi khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, có dạng hình que (rod) hoặc que ngắn (cocco-bacili). Về phân loại, Chi *Lactobacillus* thuộc Ngành Firmicutes, Lớp Bacili, Bộ Lactobacillales, Họ Lactobacillaceae. Họ vi khuẩn này cũng bao gồm các chi có quan hệ gần gũi với *Paralactobacillus* và *Pediococcus*. Chúng là vi sinh vật yếm khí, cần môi trường giàu dinh dưỡng để sinh trưởng. Trong quá trình lên men, vi khuẩn *Lactobacillus* chuyển hóa một số đường thành acid lactic. Nhóm vi khuẩn này nổi bật với khả năng sản xuất các chất kháng khuẩn và hình thành màng sinh học giúp bảo vệ niêm

mạc ruột. Chúng còn tạo ra các chất ức chế như acid béo mạch ngắn, giúp đảm bảo cân bằng pH đường ruột, làm giảm khả năng phát triển của vi sinh vật gây bệnh. Ngoài ra, *Lactobacillus* chịu ảnh hưởng từ các điều kiện lý hóa trong ruột, như pH và thế oxy hóa khử, giúp hạn chế vi khuẩn có hại phát triển. Nhóm vi khuẩn này cũng tác động đến quá trình chuyển hóa acid mật, thúc đẩy hấp thu chất béo, và hỗ trợ biểu mô ruột để tăng cường khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng. *Lactobacillus* thường sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 35 – 40 °C, đây là điều kiện lý tưởng để chúng tăng sinh khi được đưa vào đường ruột vật nuôi. Ở nhiệt độ phòng, *lactobacillus* ít hoạt động, chính vì vậy, các chế phẩm vi sinh có thành phần *lactobacillus* rất dễ bảo quản [8].

1.2.2.2 Vi khuẩn Gram dương sinh bào tử: Chi *Bacillus*

Chi *Bacillus* được phân vào ít nhất 8 nhóm loài trong cây phát sinh loài của Ngành Firmicutes. Thành viên của chi *Bacillus* đều là các vi khuẩn dị dưỡng, có tế bào hình que, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý, sản sinh các sản phẩm trao đổi chất (CO₂, diacetyl, bacteriocin) và một số loài sản sinh acid lactic. Đặc điểm nổi bật nhất của chúng là khả năng sinh nội bào tử (endospore) và đây cũng là một lợi thế quan trọng của một chủng Probiotic. Các enzym mà vi khuẩn nhóm này sinh ra có khả năng chống lại các yếu tố bất lợi bên ngoài. Chi *Bacillus* là một trong những dạng probiotic chính được sử dụng trong NTTS. Rengpipat và cộng sự chỉ ra rằng việc sử dụng các sản phẩm chứa vi khuẩn *Bacillus* sp. sẽ kích hoạt hệ miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể ở tôm sú (*Penaeus monodo*). Trong điều kiện môi trường thích hợp, vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* sẽ phát triển nhanh với số lượng rất lớn, đồng thời cạnh tranh với các vi sinh vật khác và động vật nguyên sinh về nguồn thức ăn nên phần nào ngăn cản được sự phát triển của *Vibrio* và các vi sinh vật có hại, từ đó giảm được các tác nhân gây bệnh [9]. *Bacillus subtilis* có khả năng sinh nhiều enzym nhưng quan trọng nhất là sinh enzym amylase và protease là hai loại enzym tiêu hóa. Vi khuẩn này thường tồn tại trong sản phẩm dưới dạng bào tử, nhờ vậy khi đưa vào dạ dày không bị ảnh hưởng bởi acid cũng như các men tiêu hóa ở dịch dạ dày phá hủy. Trong môi trường ruột, bào tử “nảy mầm” và phát triển thành thể sinh dưỡng giúp cân bằng hệ vi sinh có ích trong đường ruột, cải thiện hệ tiêu hóa nhất là sau khi sử dụng chất kháng sinh kéo dài [10].

1.2.2.3 Nấm men: Chi *Saccharomyces*

Nấm men là các vi sinh vật đơn bào có nhân điển hình. Chi *Saccharomyces* được xếp trong Lĩnh giới Eukaryota, Giới Nấm (fungi), Ngành Ascomycota, Phân ngành Saccharomycotina, Lớp Saccharomycetes, Bộ Saccharomycetales, Họ Saccharomycetaceae. Tế bào của nấm men *S. cerevisiae* sinh sản vô tính bằng cách

nảy chồi đa phương và được chuyển trực tiếp đến túi bào tử, có chứa bào tử túi. Ngoài ra, một đặc tính của Chi *Saccharomyces* là khả năng lên men mạnh mẽ các loại đường. Đây cũng là đặc tính mong muốn của các chủng nấm men *S. cerevisiae* được sử dụng trong sản xuất thực phẩm, từ nướng bánh mì đến sản xuất đồ uống có cồn dựa trên nhiều loại thực vật thô. Trong NTTS, *S. cerevisiae* giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột, bảo vệ niêm mạc, phòng ngừa nhiều bệnh lý liên quan đến đường ruột và hệ tiêu hóa, nâng cao khả năng hấp thu chất dinh dưỡng từ thức ăn. Ngoài ra, nhóm này có thể sinh trưởng tốt ở pH 4,5 - 5,5, nên nó chịu được tác dụng của môi trường acid trong ruột, chúng có khả năng phát triển tốt trong điều kiện môi trường chứa ri đường, amonisulfat, DAP, MgSO₄, acid H₂SO₄ [11].

1.2.3. Các cơ chế tác động của probiotic

1.2.3.1. Cạnh tranh với các vi sinh vật gây bệnh

Trong một số nghiên cứu trước đây phát hiện ra rằng việc sử dụng vi khuẩn có lợi làm giảm số lượng vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* trong ruột tôm thẻ chân trắng [12]. Probiotic cũng đã được sử dụng trong thử nghiệm để kiểm soát bệnh do vi khuẩn ở cá [13]. Ngoài ra, probiotic còn là nguồn kháng sinh giá rẻ và phần lớn không độc hại, tổng hợp nhiều chất chuyển hóa có chức năng kháng khuẩn, do đó có lợi cho sản xuất thương mại. Probiotic xâm nhập vào đường tiêu hóa của vật nuôi và đối kháng với các tác nhân gây bệnh thông qua việc sản xuất ra các chất kháng khuẩn, cạnh tranh chất dinh dưỡng và vị trí bám dính với các vi sinh vật gây bệnh [14]. Một số nghiên cứu đã cho biết *Lactobacillus rhamnosus* và *Lactobacillus plantarum* có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Escherichia coli* gây bệnh đường ruột trong đường tiêu hóa [15].

Probiotic có thể ngăn ngừa nhiễm trùng đường tiêu hóa do sản xuất các chất kháng khuẩn ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh bằng cách cải thiện chức năng hàng rào niêm mạc ruột do tiết ra các chất bảo vệ ruột chẳng hạn như bacteriocin, ethanol, axit hữu cơ, diacetyl, acetaldehyde, hydrogen peroxide và peptide. Các hợp chất này, đặc biệt là peptide và bacteriocin, làm tăng tính thấm màng của các tế bào đích, làm phân cực màng và cuối cùng dẫn đến chết tế bào [15]. Hầu hết các bacteriocin tiêu diệt các tế bào đích bằng cách tạo ra các lỗ hổng và xâm nhập vào màng tế bào chất. Một số ít nghiên cứu đã được tiến hành về quá trình lên men của probiotic sử dụng các chất xơ prebiotic không hòa tan dẫn đến sự hình thành các axit béo chuỗi ngắn và trung bình nên cũng làm giảm độ pH trong ruột, do đó ức chế vi khuẩn gây bệnh [16].

1.2.3.2. Tăng cường chuyển hóa thức ăn

Các chủng probiotic có khả năng sản sinh các enzym ngoại bào như

proteases, lipase, amylase, cellulase... là các enzym tiêu hóa cũng như các yếu tố kích thích sinh trưởng, từ đó nâng cao hiệu quả chuyển hóa và hấp thụ thức ăn của động vật thủy sản. Nhiều nghiên cứu về probiotic thuộc nhóm *Bacteroides* và *Clostridium* sp. sinh trưởng trong đường tiêu hóa giúp cung cấp các vitamin, acid béo và các acid amin cần thiết cho vật chủ [17]. Theo nghiên cứu của Zheng và Wang, việc bổ sung *Lactobacillus pentosus* đã làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn ở tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Bổ sung *Lactobacillus plantarum* với liều lượng 50, 100, hoặc 1000 mg/kg thức ăn trong 12 tuần đã cải thiện đáng kể hoạt động của các enzym amylase, lipase và protease trong hệ tiêu hóa của cá rô phi sông Nile, bên cạnh đó hiệu quả sử dụng thức ăn tăng lên theo liều lượng probiotic [18]. Việc bổ sung *Bacillus subtilis* vào thức ăn với liều lượng 10^7 và 10^9 CFU/kg thức ăn trong vòng năm tuần đã làm tăng đáng kể sự tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) [19]. Cua bùn (*Scylla paramamosain*) đã tăng trọng lượng và có tốc độ tăng trưởng nhanh hơn nhiều sau khi được bổ sung chế độ ăn với *Enterococcus faecalis* và *Pediococcus acidilacti* [20].

1.2.3.3. Điều hòa hệ miễn dịch

Probiotic có thể ngăn ngừa nhiễm trùng do tác nhân gây bệnh bằng cách tăng cường hệ thống miễn dịch của vật chủ và khả năng miễn dịch tế bào không đặc hiệu trong cơ thể. Nhiều báo cáo cho thấy việc sử dụng các nhóm probiotic có thể ảnh hưởng đến hoạt động của các thực bào đơn nhân (bạch cầu đơn nhân, đại thực bào) và bạch cầu đa nhân trung tính (bạch cầu trung tính), tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), v.v trong hệ thống miễn dịch không đặc hiệu: Chủng *Bacillus subtilis* S11 ảnh hưởng tích cực đến khả năng miễn dịch tế bào và dịch thể ở tôm sú *Penaeus monodon*, giúp chống lại bệnh tật, bảo vệ sức khỏe [9]. *Lactobacillus rhamnosus* bổ sung trong chế độ ăn làm tăng khả năng hô hấp ở cá hồi vân [21]. Do đó, probiotic là vi khuẩn có lợi không chỉ có khả năng ức chế mầm bệnh mà còn điều chỉnh hệ thống miễn dịch của vật chủ bởi khả năng sở hữu các phân tử tạo liên kết như peptidoglycan (PGN), axit lipoteichoic (LTA), exopolysaccharides (EPS) và các axit nucleic có thể được nhận biết bởi các thụ thể nhất định tạo ra một dòng tín hiệu có thể dẫn đến việc sản xuất các cytokine, chemokine và các phân tử tác động khác [22].

1.2.4. Tình hình nghiên cứu về probiotic gần đây

Ở Đồng bằng sông Cửu Long, người nuôi tôm cá thâm canh và bán thâm canh đã sử dụng probiotic để cải thiện đường ruột của tôm cũng như cải thiện môi trường nước từ nhiều thập kỉ qua. Những dòng vi khuẩn được sử dụng trong NTTS

được biết đến như là các dòng thuộc *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas* và *Saccharomyces* [7]. Trần Thị Ngọc Phương và Đặng Thị Hoàng Oanh đã phân lập được loài *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus fermentum* trong ruột cá tra có khả năng đối kháng với *Edwardsiella ictalurid* [23]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Trúc Linh cho thấy, loài *Litopenaeus vannamei* được bổ sung vào thức ăn, tỉ lệ sống của tôm được cải thiện có ý nghĩa sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng [24].

Nhóm nghiên cứu của TS. Hoàng Phương Hà ở Viện Công nghệ sinh học đã tạo ra sản phẩm chứa probiotic, bao gồm *Bacillus subtilis*, và *Lactobacillus acidophilus*, có khả năng sinh các enzym tiêu hóa, kháng lại *V. parahaemolyticus*, tạo biofilm tốt, được lên men với khô đậu nành để bổ sung vào thức ăn nuôi tôm thẻ chân trắng, tạo ra sản phẩm có khả năng cân bằng hệ vi sinh đường ruột, kích thích để làm tăng cường hệ miễn dịch, tăng cường sự chuyển hóa thức ăn từ đó làm tăng sản lượng tôm [25]. Ngoài ra Viện Sinh học Nhiệt đới đã thành công trong việc nghiên cứu và sản xuất chế phẩm probiotic BioII gồm hỗn hợp các vi sinh vật và enzym tiêu hóa dùng trong NTTS, chế phẩm này đã được khảo nghiệm trên ao nuôi tôm sú ở các tỉnh cho kết quả khả quan và được Công ty thuốc thú y và NTTS đưa ra thị trường [26].

1.3. Tổng quan về tảo

1.3.1. Giới thiệu về tảo và tiềm năng ứng dụng trong NTTS

Một số loại tảo như *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Spirulina* sp.... hay rong biển chứa hàm lượng cao các hoạt chất sinh học như: protein, lipid, carbohydrate, axit amin thiết yếu, sắc tố, các vitamin và khoáng chất. Một số loài vi tảo đang sử dụng hiện nay có hàm lượng protein cao hơn so với gạo, đậu nành, bột mì, sữa và thậm chí cả thịt [27]. Các hoạt chất này là nguồn nguyên liệu quý, có thể sử dụng trong y dược, mỹ phẩm phục vụ nhu cầu chăm sóc sức khỏe cho con người. Trong đó, carotenoid có hoạt tính kháng oxy hóa, kháng viêm, chống béo phì, chống u và ung thư. Sinh khối tảo chủ yếu là *Spirulina* spp. có thể sử dụng làm thực phẩm, thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe, dược, mỹ phẩm... [28]

Trong lĩnh vực thủy sản, việc sản xuất vi tảo là bước quan trọng để cung cấp nguồn thức ăn sơ cấp cho hầu hết đối tượng nuôi trong các trang trại. Vi tảo đóng vai trò không thể thay thế trong cơ cấu thức ăn của ấu trùng nhuyễn thể hai mảnh vỏ, ấu trùng giáp xác và một số loài cá ở giai đoạn sớm nhờ giàu dinh dưỡng và có kích thước phù hợp với miệng của ấu trùng. Giá trị dinh dưỡng quan trọng nhất của vi tảo đối với động vật thủy sản là các axit béo, đặc biệt là Eicosapentaenoic (EPA), Arachidonic acid (AA) và Docosahexaemoic acid (DHA). Do không thể tự tổng

hợp một số axit béo thiết yếu nên ấu trùng động vật thủy sản phải lấy chúng thông qua chuỗi thức ăn vi tảo. Hàm lượng protein ở tảo có thể chiếm tới 60% sinh khối khô (SKK), carbohydrate chiếm tới 60% SKK, lipid chiếm tới 70% SKK, phụ thuộc vào từng loài tảo và điều kiện nuôi. Các chất thứ cấp từ vi tảo như carotenoid giúp thúc đẩy tăng trưởng và kích thích sinh trưởng, có khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống viêm và đặc tính kích thích miễn dịch cho cả sinh vật nước ngọt và biển. Các axit béo không no đa nối đôi (polyunsaturated fatty acid - PUFA) có trong lipid vi tảo bao gồm axit arachidonic (ARA) (C20: 4n-6) và DHA (C22: 6n-3). Các loài vi tảo như *Cryptothecodinium* và *Schizochytrium* chứa DHA; *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis* và *Diacronema* chứa EPA (C20: 5n-3), còn *Cryptothecodinium* và *Schizochytrium* chứa ARA. Hàm lượng EPA của các loài vi tảo chiếm từ 7 đến 34% TFA (Total fatty acid – tổng số axit béo). Các axit béo này rất hiếm và khó tổng hợp trong phòng thí nghiệm, chúng được tìm thấy trong dầu cá và một lượng nhỏ có trong dầu thực vật bao gồm cọ, đậu tương, hạt cải dầu. Vi tảo có thể tích lũy một lượng lớn lipid chứa thành phần axit béo có lợi về mặt dinh dưỡng khi phát triển trong điều kiện nuôi cấy tối ưu [29].

Tác giả Zhang và cộng sự đã cho thấy, bổ sung PUFA trong khẩu phần ăn, đặc biệt là các omega-3 và omega-6 có thể tăng cường khả năng miễn dịch không đặc hiệu, giúp cải thiện hiệu suất tăng trưởng và phát triển buồng trứng khi so sánh với các chế độ thức ăn khác của tôm thẻ chân trắng. Vi tảo giúp cải thiện thành phần axit béo của cá và tôm bằng cách cải thiện tỷ lệ omega-3 hay omega-6, tăng cường hàm lượng PUFA. Động vật thủy sản có giá trị dinh dưỡng cao hơn khi thành phần axit béo của chúng được cải thiện, mang lại lợi ích cho người tiêu dùng [30].

Các nghiên cứu đã chứng minh rằng, sử dụng kết hợp hai loài vi tảo *Nannochloropsis oculata* và *Schizochytrium* sp. làm thức ăn nuôi cá trê Nile (*Oreochromis niloticus*) có thể cải thiện chất lượng dinh dưỡng và chỉ số tăng trưởng của chúng [31]. Trong một nghiên cứu khác, *Nannochloropsis* sp. và *Isochrysis* sp. đã được sử dụng để thay thế trong chế độ ăn của cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*). So với thức ăn truyền thống là bột cá và dầu cá thì sử dụng sinh khối *Isochrysis* sp. làm thức ăn đã giúp làm tăng đáng kể hệ số tiêu hóa cho protein thô, axit amin, lipid và các axit béo [21].

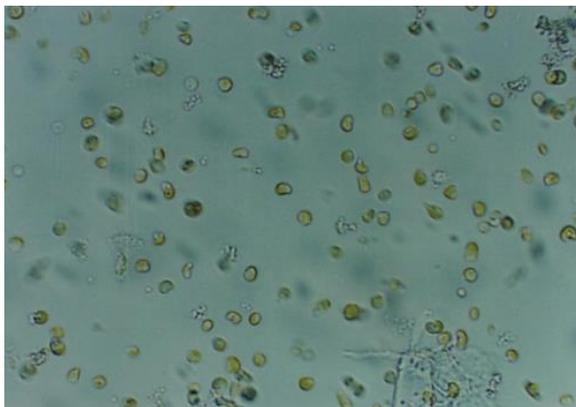
Ngoài việc sử dụng thức ăn trực tiếp, vi tảo còn được sử dụng gián tiếp thông qua tăng cường dinh dưỡng cho động vật phù du (Copepods, luân trùng, Artemia), làm thức ăn cho ấu trùng tôm, cá hoặc bổ sung vào thành phần thức ăn để cải thiện màu sắc của đối tượng nuôi. Các sắc tố vi tảo rất quan trọng đối với hiệu suất dinh dưỡng của chúng trong NTTS. Carotenoid, chlorophyll và phycobilin là ba loại sắc

tổ quang hợp cơ bản của vi tảo. Sắc tố vi tảo có màu sắc tự nhiên bắt mắt bao gồm các thành phần có giá trị cao với các phẩm chất tăng cường sức khỏe bao gồm chất chống oxy hóa, tiền chất vitamin, bảo vệ thần kinh và chất tăng cường miễn dịch. Những sắc tố này có thể đáp ứng nhu cầu gia tăng đối với tự nhiên màu sắc do lo ngại về sức khỏe về tác dụng phụ của chất màu tổng hợp. NTTS sử dụng hàm lượng carotenoid cao như carotene và astaxanthin, do tạo thêm sắc tố đỏ có tác dụng chống oxy hóa và làm tăng giá trị trên thị trường trong nước và xuất khẩu của chúng [32].

1.3.2. Một số loại tảo có tiềm năng ứng dụng trong NTTS.

1.3.2.1. *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana (*I. galbana*) là loài vi tảo đơn bào có màu nâu vàng, kích thước 4 – 6 μm , hình bầu dục có hai roi bằng nhau, chủ yếu sống trong môi trường nước mặn, tuy nhiên cũng có một số loài sống trong môi trường nước lợ hay nước ngọt. Trong nhiều thập kỷ trở lại đây, loại tảo này đã được sử dụng làm thức ăn trong NTTS và thức ăn gia cầm bởi các giá trị dinh dưỡng mà nó mang lại. Thành phần dinh dưỡng của *I. galbana* chứa từ 50 - 56% protein, hàm lượng lipid chiếm 12 - 14% và 10- 17% carbohydrate. Đặc biệt, *I. galbana* rất giàu các acid béo không no đa nối đôi omega 3 như EPA và DHA, carotenoid và các hợp chất hoạt chất sinh học khác [33].



Hình 1.1: Tảo *Isochrysis galbana* [34]

Hiện nay, *I. galbana* đang được ứng dụng rộng rãi như một chất bổ sung vào thức ăn NTTS do kích thước tế bào nhỏ, dễ tiêu hóa, có giá trị dinh dưỡng cao, chất chống oxy hóa, kích thích sự phát triển của động vật. Theo Oostlander và cộng sự, vi tảo là nguồn dinh dưỡng chính ở giai đoạn ấu trùng của tôm, cá và là nguồn thức ăn ở tất cả các giai đoạn của nhuyễn thể hai mảnh vỏ.

Nó được sử dụng làm nguồn thức ăn duy nhất trong giai đoạn đầu đời của nhím biển [35]. Molina Grima và cộng sự đã phát triển nhiều chủng từ chi *Isochrysis* để tạo các axit eicosapentaenoic (EPA) [36].

1.3.2.2. *Nannochloropsis*

Nannochloropsis oculata (*N. oculata*) là một thành viên của chi *Nannochloropsis*. Đây là một loại tảo đơn bào có thể sống được ở cả vùng nước ngọt và nước biển. Nó có các tế bào hình cầu hoặc hơi hình trứng với đường kính 2–5 μm , chỉ chứa diệp lục A với sắc tố violaxanthin [37].



Hình 1.2: Tảo *Nannochloropsis oculata* [38]

Thành phần dinh dưỡng của *N. oculata* chứa 28,7 - 40,4% carbohydrate, 22,2 - 37,4% protein thô và 15,1 - 21,7% tổng lượng lipid theo trọng lượng khô, cũng như các khoáng chất, vitamin và chất chống oxy hóa như carotenoid. Chúng chứa hàm lượng axit béo không no đa nối đôi (PUFA), chủ yếu là axit eicosapentaenoic (EPA) chiếm 3,2% khối lượng khô, chất chống oxy hóa (0,8% ascorbic acid) và hàm lượng vitamin B12 có thể đáp ứng nhu cầu phát triển của các động vật thủy sản ở giai đoạn đầu của quá trình phát triển [38].

N. oculata có thành tế bào rất dày. Loài tảo này đã được xác định là một trong những loài triển vọng nhất để sản xuất biodiesel do chúng phù hợp với nuôi cấy thâm canh, tốc độ tăng trưởng lý tưởng, khả năng thích nghi với môi trường tốt, khả năng chống ô nhiễm, thành phần axit béo lý tưởng, dễ biến đổi gen và khả năng mở rộng quy mô [38].

2.3.2.3. *Spirulina platensis*

Spirulina (hay *Artthrospira*) thuộc ngành vi khuẩn lam (Cyanobacteriophyta) đa bào, dạng sợi. Chi *Spirulina* với hai loài quan trọng là *Spirulina maxima* và *Spirulina platensis*.



Hình 1.3: Tảo *Spirulina platensis* [39]

Spirulina platensis (*S. platensis*) nổi bật với hàm lượng dinh dưỡng cao, chiếm 60-70% protein, 15- 20% cacbohydrate, 4-7% lipid, 0,76% chlorophyll a, 0,23% carotenoid theo trọng lượng sinh khối khô. Bên cạnh đó, nó còn cung cấp đáng kể các axit béo thiết yếu như axit oleic và γ -linolenic, cùng với lượng vitamin B12, β -carotene, sắt, canxi và photpho, đã được xác nhận là an toàn cho sức khỏe người tiêu dùng.

Việc thiếu cellulose trong thành tế bào của *S. platensis* giúp tiêu hóa loại thực

phẩm này dễ dàng hơn so với vi tảo hoặc tảo lớn. *S. platensis* từ lâu đã được sử dụng làm thực phẩm chức năng cho con người, động vật nuôi trồng thủy sản và sản xuất các loại thức ăn cho gia súc, gia cầm, chúng được trồng ở nhiều nước như Mỹ, Trung Quốc, Đài Loan, Thái Lan, Ấn Độ. Đến nay diện tích nuôi trồng đã mở rộng hơn lên tới hàng trăm hecta như ở Sosa Texcoco (Mexico), Hawaii (Mỹ), Siam (Thái Lan), Hainan (Trung Quốc) [40].

1.3.3. Các công nghệ nuôi trồng tảo

Theo thống kê của Cục Thủy sản vào năm 2023, Việt Nam có hơn 827 loài rong tự nhiên, trong đó có 88 loài có giá trị kinh tế, tổng diện tích nuôi trồng rong, tảo biển của nước ta ước đạt 16.000 ha với sản lượng 150 nghìn tấn. Các chuyên gia thủy sản nhận định rằng rong và tảo biển có tiềm năng phát triển lớn, đặc biệt là ở các khu vực như Quảng Ninh, Hải Phòng, Quảng Ngãi, Phú Yên, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Bình Thuận, Bà Rịa-Vũng Tàu, Cà Mau và Kiên Giang. Do đó, trong chiến lược phát triển ngành thủy sản, Việt Nam đặt mục tiêu đạt sản lượng rong và tảo biển khoảng 180 nghìn tấn vào năm 2025 và 500 nghìn tấn vào năm 2030 [41].

Công nghệ nuôi vi tảo ở Việt Nam hiện nay đã có bước phát triển vượt bậc và đã dần làm chủ được công nghệ nuôi. Các nghiên cứu nuôi tảo *I. galbana* và *N. oculata* trong các hệ thống nuôi kín dạng tấm đã giúp nâng cao chất lượng sinh khối tảo, giảm khả năng lây nhiễm với mật độ tảo *N. oculata* lên tới 200-500 triệu tế bào/mL, với năng suất trung bình đạt 0,9 g/L/ngày. Ngoài ra, một hệ thống kín dạng ống với dung tích 20L đã được sử dụng để nuôi sinh khối *N. oculata* với mật độ tế bào cao nhất đạt 197 triệu tế bào/mL [42]. Viện Nghiên cứu hải sản đã thiết kế các hệ nuôi kín dạng ống, dạng tấm, dạng bể kính với mật độ tảo *N. oculata* ổn định từ 200-250 triệu tế bào/mL [43].

Cho đến nay, nước ta đã có nhiều cơ sở nuôi trồng *S. platensis* (tên địa phương là tảo xoắn) lớn như Công ty CP Tảo Vĩnh Hảo ở Bình Thuận với năng suất 15 -17 tấn tảo/năm; Công ty tảo xoắn Đại Việt có 2 nhà máy nuôi trồng tảo lớn tại Lạng Sơn và Thanh Hóa với công suất đạt 66 tấn tảo/ năm. Tuy nhiên, trong quá trình nuôi tảo xoắn trên quy mô công nghiệp và bán công nghiệp chỉ có khoảng 60 - 70% tảo thu hoạch đạt tiêu chuẩn để sử dụng cho người và khoảng 30 - 40% sinh khối tảo bị tạp nhiễm khác nhau trong quá trình nuôi [44]. Bên cạnh đó, các hình thức nuôi tảo trong các hệ thống hở với ưu điểm chi phí đầu tư thấp, dễ áp dụng với trại quy mô nhỏ như bể kính, trụ đứng túi nilon PE trong lồng sắt, túi nilon PE treo khung, trụ polycarbonate (PC) và bể raceway hay nghiên cứu sử dụng môi trường nuôi rẽ tiền nhưng vẫn đảm bảo chất lượng sinh khối *S. platensis* nuôi trồng đã

được công bố [45]. Vì vậy, các loại tảo này có thể được dùng làm nguồn cung cho động vật thủy sản để giảm thiểu lãng phí.

Sở Khoa học và công nghệ tỉnh Nam Định đã phối hợp với viện Công nghệ Môi trường (Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam) thực hiện đề tài khoa học và công nghệ cấp tỉnh, thu thập và tuyển chọn được 2 loại chủng tảo là vi tảo *Nannochloropsis oculata* và vi tảo *Isochrysis galbana* có sự sinh trưởng, phát triển tốt trong môi trường nước biển Nam Định để sử dụng cho quy trình sản xuất tảo sinh khối làm thức ăn cho ngao giống [43].

Phòng công nghệ Tảo - Viện công nghệ sinh học là đơn vị đi đầu trong việc xây dựng, triển khai và chuyển giao công nghệ nuôi trồng, chế biến và sử dụng một số loài vi tảo kinh tế, giàu dinh dưỡng trên quy mô khác nhau (từ phòng thí nghiệm, pilot, quy mô bán công nghiệp, công nghiệp) như *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella* sp., *Isochrysis galbana*,... phục vụ cho cuộc sống. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số loại vi tảo quang tự dưỡng và dị dưỡng giàu axit béo được dùng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người, cho động vật nuôi, đặc biệt trong nuôi trồng thủy sản (ấu trùng và nuôi tôm thương phẩm).

1.4. Lên men vi sinh vật có lợi trong môi trường chứa tảo

1.4.1. Lợi thế của tảo

Bên cạnh các hợp chất giàu dinh dưỡng có trong tảo như đã nói ở trên thì nó còn chứa một lượng chất xơ thực phẩm khá cao, chiếm khoảng 25–75% trọng lượng khô đối với tảo biển, trong đó có khoảng 50–85% chất xơ hòa tan [46].

Gần đây, đã có nhiều nghiên cứu chuyên sâu về sự tồn tại của các probiotic khi có mặt prebiotic (chất xơ thực phẩm) để phục vụ cho NTTS. Khi có mặt của prebiotic thì vai trò của probiotic có thể được tăng lên rõ ràng trong việc cải thiện hệ vi sinh đường ruột, cải thiện các chỉ tiêu huyết học, tăng trưởng, miễn dịch và sức đề kháng chống lại vi khuẩn gây bệnh. Prebiotic hoạt động như một cái bẫy đối với vi khuẩn gây hại. Nhiều loại vi khuẩn gây hại sử dụng các thụ thể oligosaccharide trong ruột để bám vào bề mặt niêm mạc ruột, từ đó gây ra các bệnh lý đường ruột. Tuy nhiên, các prebiotic có khả năng mô phỏng các thụ thể này, khiến vi khuẩn gây hại liên kết với prebiotic thay vì bám vào niêm mạc ruột, giúp bảo vệ niêm mạc và ngăn ngừa các bệnh đường ruột [47].

Prebiotic là chất xơ thực phẩm không tiêu hóa được nhưng có lợi cho vật chủ, có khả năng chịu đựng môi trường axit trong dạ dày, thúc đẩy sự phát triển của hệ vi khuẩn đường ruột từ đó giúp cải thiện sức khỏe của vật chủ. β -glucan, inulin, arabinoxylan oligosaccharide (AXOS), mannan oligosaccharide (MOS),

galactooligosaccharide (GOS), fructooligosaccharides (FOS) và oligosaccharides là những prebiotic thường được sử dụng trong NTTS với các tác dụng thúc đẩy hiệu suất tăng trưởng, tăng hiệu quả sử dụng thức ăn, tăng cường hệ thống miễn dịch và kích thích khả năng kháng bệnh của các loài NTTS [47].

Các thành phần polysaccharides trong tảo có thể bị phân hủy thành các đoạn ngắn (oligosaccharide) nhờ quá trình lên men của vi sinh vật có lợi. Quá trình này tạo ra các axit béo chuỗi ngắn và các hợp chất hữu cơ, kích thích sự phát triển của các vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus* và *Bifidobacteria* khi chúng đến ruột kết, hỗ trợ sức khỏe của vật chủ [47].

Polysaccharides từ tảo, ví dụ như β -glucan của chủng *Chlorella vulgaris* và sinh khối tảo xoắn đã được công nhận là prebiotic trong chế độ ăn uống. Việc bổ sung prebiotic như fructan trong chế độ ăn uống có thể thúc đẩy sự phát triển của các vi khuẩn có lợi. Quá trình lên men của vi khuẩn probiotic với sự có mặt của chất xơ sẽ tạo ra một nhóm axit béo chuỗi ngắn và trung bình. Những axit này làm giảm độ pH trong ruột, từ đó cũng có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh [48]. Tóm lại, các thành phần prebiotic trong vi tảo có tác động tích cực lên hệ vi sinh vật của vật chủ.

Prebiotic chỉ tác động tích cực khi cơ thể đã có sẵn các vi sinh vật hữu ích chứ bản thân prebiotic không tự sản sinh ra các vi sinh vật này. Do đó, việc kết hợp prebiotic và probiotic để tăng cường chất dinh dưỡng và hoạt động trao đổi chất góp phần tăng trọng lượng và hiệu quả sử dụng thức ăn. Sự cải thiện này dễ dàng nhận thấy nhất khi động vật thủy sản được nuôi trong điều kiện môi trường không tối ưu hoặc có sự hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh [49].

1.4.2. Kết hợp lên men sinh khối vi khuẩn trong môi trường tảo

Thời gian gần đây, đã có nhiều nghiên cứu về việc kết hợp vi khuẩn probiotic và vi tảo cả trong môi trường thực tế (như trong nuôi trồng thủy sản) và trong phòng thí nghiệm. Sự kết hợp này tạo ra hiệu ứng hiệp đồng, giúp tăng tốc độ phát triển của cả probiotic và tảo, đồng thời kích thích sản xuất ra các axit béo chuỗi ngắn và các hợp chất hữu cơ. Người ta thấy vi tảo *I. galbana* có thể phát triển nhanh hơn khi được nuôi cấy cùng với các vi sinh vật probiotic khác [50].

Trong NTTS, việc bổ sung vi tảo cùng với probiotic đã chứng tỏ có thể cải thiện chức năng ruột và tăng sản lượng sản xuất, như trong các thí nghiệm với cá, trai và tôm. Cũng đã có nghiên cứu cho thấy, việc kết hợp *Chlorella sorokiniana* với *Lactobacillus plantarum* và *Bifidobacterium longum* có thể kéo dài thời gian sống của các probiotic này trong sản phẩm thực phẩm bảo quản lạnh (ở 4°C) và tăng cường khả năng chống virus của chúng đối với *rotavirus* [51].

Đã có bằng chứng cho thấy *Spirulina platensis* thúc đẩy sự phát triển của các vi khuẩn có lợi *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* và *Bifidobacteria* trong đường tiêu hóa. Đồng thời, vi tảo còn ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh như *Proteus vulgaris* hay *Klebsiella pneumoniae* [52]. Nghiên cứu của Abuzer và cộng sự vào năm 2019 đã chứng minh, tảo *Spirulina platensis* có tác dụng như một chất kích thích sinh trưởng khi bổ sung vào môi trường lên men của *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp., *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobacterium lactis* làm tăng sinh trưởng và tỷ lệ sống cho các chủng probiotic này, do tảo chứa nhiều hợp chất dinh dưỡng (như protein, axit amin tự do, và peptide), khoáng chất, vitamin B, EPS, adenine, hypoxanthine và tất cả các chất dinh dưỡng hữu cơ và vô cơ [53]. Ngoài ra, vi khuẩn lam *S. platensis* được coi là chất mang protein và chất xơ đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì độ ổn định của sản phẩm lên men tạo thành. Một số nghiên cứu khác về quá trình lên men vi khuẩn lactic với môi trường chứa vi tảo đã cho thấy, vi khuẩn lactic có thể thủy phân các polyme thành tế bào của vi tảo thành các hợp chất đơn giản hơn thông qua các hoạt động trao đổi chất của chúng, tạo ra các phân tử có đặc tính dinh dưỡng cao hơn [54]. Hơn nữa, sinh khối tươi của tảo *S. platensis* được sinh trưởng trong môi trường chứa *Lactobacillus plantarum* đã giúp tăng hàm lượng các hợp chất phenolic, C-phycoyanin và methionine tự do, cũng như cải thiện khả năng thu gom gốc oxy hóa tự do và khả năng phân hủy protein giải phóng các đơn phân peptide tốt hơn so với mẫu không có mặt vi khuẩn [55]. Nghiên cứu của Pereira và cộng sự cũng cho thấy, *S. platensis* là cơ chất phù hợp cho tăng trưởng của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*, sản phẩm sau lên men đã cho thấy hoạt tính chống oxy hóa và hàm lượng phenolic tăng rõ rệt, cũng như hàm lượng acid lactic tăng hơn so với mẫu đối chứng dẫn đến độ pH trong môi trường giảm, từ đó giúp ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, sản phẩm sau lên men cho hàm lượng nitơ trong sinh khối vi tảo tăng lên, nên sự phân hủy và khả dụng sinh học của protein cao hơn và giảm hàm lượng chất béo so với đối chứng không lên men [56]. Vì vậy tảo *S. platensis* có thể được đưa vào các công thức sản xuất chế phẩm sinh học mới để thúc đẩy sự ổn định của thành phần vi sinh vật trong sản phẩm tạo thành. *Chlorella pyrenoidosa* và *Chlorella ellipsoidea* cũng có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh *Listeria monocytogenes* và nấm *Candida albicans* nhờ chứa polysaccharides [57].

Trong một nghiên cứu khác, Kaga và cộng sự đã sử dụng 10 loài vi tảo và vi khuẩn lam (*Notophryxus lobatus*, *Nostoc commune*, *Nostoc flagelliforme*, *Nostoc verrucosum*, *Arthrospira platensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorogonium* spp.,

Pennisetum purpureum, *Pleurochrysis carterae*, và *Euglena* spp.) để thử nghiệm trong quá trình lên men của *Lactococcus lactis* spp. và *Lactiplantibacillus plantarum*. Kết quả thu được chỉ ra, không phải tất cả các loài vi tảo hay vi khuẩn lam đều có thể hỗ trợ quá trình lên men của vi khuẩn lactic, chỉ có dịch chiết của *N. commune* và *Euglena* spp. cho hiệu quả tốt trong việc tăng hoạt tính thu hồi chất oxy hóa tự do và hoạt động anti-glycation của vi khuẩn [58]. Do vậy, việc lựa chọn loại tảo thích hợp làm nguồn cung cấp dinh dưỡng cho vi sinh vật có lợi, đồng thời khai thác các hoạt chất sinh học của chúng là hướng đi phù hợp và có tính khả thi cao.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Chủng giống

Bốn chủng vi khuẩn có lợi ký hiệu: P1, P2, P3, P4 thuộc bộ chủng giống vi khuẩn có lợi phân lập từ ruột tôm, chủng *Lactobacillus acidophilus* LB và chủng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus* được lưu giữ trong bộ chủng giống của phòng CNSH tái tạo môi trường – Viện Công nghệ sinh học.

Sinh khối các loại tảo khô gồm: *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Spirulina platensis* sử dụng trong các thí nghiệm do phòng Công nghệ tảo - Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

2.1.2. Hóa chất

Một số hóa chất sử dụng trong thí nghiệm: Cao thịt (Trung Quốc), Cao men (Trung Quốc), Pepton (Trung Quốc), NaCl (Trung Quốc), KH_2PO_4 (Trung Quốc), K_2HPO_4 (Trung Quốc),... và một số hóa chất khác.

2.1.3. Môi trường và dung môi

Môi trường MPA (Meat Pepton Agar) (g/L): Cao thịt (5); pepton (10); NaCl (5); pH~7

Môi trường MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (g/L): Glucose (20); Cao thịt (10); Cao nấm men (5); Pepton (10); K_2HPO_4 (2); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); CH_3COONa (5); Triamoniumcitrat (2); $\text{MnSO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,2); Tween80 (1mL); pH ~7.

Môi trường cơ bản: K_2HPO_4 (2), NH_4Cl (2), MgSO_4 (0,2), Tween80 (100 μl);

Môi trường thử hoạt tính enzym amylase : Tinh bột (1%), Agar (2%)

Môi trường thử hoạt tính enzym protease: Casein (0,1%), Agar (2%)

Môi trường thử hoạt tính enzym cellulase: CMC (1%), Agar (2%)

Dung dịch đệm PBS (Phosphate Buffered Saline) (g/L): KH_2PO_4 (9,3); K_2HPO_4 (6,3); pH~7

2.1.4. Trang thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ được sử dụng trong thí nghiệm: Cân kỹ thuật (Ohaus, Mỹ), máy ly tâm lạnh (Thermo Fisher, Mỹ), máy lắc (Trung Quốc), lò vi sóng (Rolex, Trung Quốc), tủ cấy vô trùng (Biosharp, Trung Quốc), pipet các loại (Effendoft, Mỹ) và một số vật tư tiêu hao khác như đĩa Petri, bình tam giác, ống Falcon, ống Effendoft...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzym ngoại bào, kháng vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus*.

Từ bộ sưu tập chủng giống của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, tiến hành hoạt hóa các chủng vi khuẩn có lợi trên đĩa môi trường thạch, quan sát đặc điểm hình thái. Sau 24 - 48 giờ nuôi các chủng vi khuẩn nghiên cứu trong môi trường dịch MPA đặc trưng cho từng nhóm vi khuẩn, tiến hành đánh giá hoạt tính sinh enzym ngoại bào và kháng vi khuẩn *V. Parahaemolyticus* theo phương pháp mô tả ở mục 2.2.3, 2.3.4.

* *Định danh vi khuẩn nghiên cứu theo phương pháp sinh học phân tử*

Các chủng vi khuẩn lựa chọn được nuôi cấy qua đêm trong môi trường MPA lỏng trước khi tiến hành tách ADN. ADN tổng số được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit Thermo Fisher (Mỹ). Gen 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3'), với chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: biến tính 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ nhiệt với mỗi chu kỳ là 95°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút; cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Sản phẩm thu được sau quá trình PCR được kiểm tra bằng việc điện di trên gel agarose 1%, điện áp 100V trong 30 phút. Sau đó gửi đến Apical Scientific (Singapore) để tiến hành giải trình tự. Trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn được phân tích và so sánh với các chủng tương đồng trên cơ sở dữ liệu ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng công cụ BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên mức độ tương đồng của các trình tự nucleotide giữa các loài bằng phần mềm MEGA 6.0 (The Molecular Evolution Genetics Analysis), thiết lập trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Kimura, sử dụng thuật toán Neighbor-Joining với hệ số bootstrap 1000 lần lặp lại [59].

2.2.2. Sàng lọc loài tảo khô làm môi trường lên men vi khuẩn có lợi

Sinh khối các loại tảo có nguồn gốc Việt Nam như *Spirulina platensis* (*S. platensis*), *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*), *Isochrysis galbana* (*I. galbana*) sau khi thu hoạch được sấy khô và nghiền thành bột, hòa riêng rẽ từng loại bột tảo trong dung dịch đệm PBS với các nồng độ bột tảo khác nhau: 1%, 2%, 3%, 3,5% (w/v) sử dụng làm môi trường nuôi các chủng vi khuẩn đã sàng lọc. Bổ sung dịch nuôi các chủng vi khuẩn nghiên cứu với tỷ lệ 1%, nuôi lắc 100 vòng/phút ở 35 °C. Lấy mẫu theo ngày trong 3 ngày liên tiếp. Đánh giá khả năng sinh trưởng của vi khuẩn nghiên cứu trong các môi trường chứa tảo khô và môi trường MPA (để so

sánh) bằng cách trang mẫu trên đĩa thạch và sử dụng phương pháp đếm khuẩn lạc theo phương pháp nêu ở mục 2.2.8. Hoạt tính sinh enzym ngoại bào và hoạt tính kháng khuẩn của vi khuẩn nghiên cứu cũng được kiểm tra theo phương pháp mô tả ở mục 2.2.3, 2.3.4.

Chủng *Lactobacillus acidophilus* LB cũng được tiến hành đánh giá ảnh hưởng của loại tảo và nồng độ tảo bổ sung đến sinh trưởng và hàm lượng axit lactic tạo thành, bằng cách nuôi cấy chủng vi khuẩn trong môi trường đệm PBS có bổ sung 3%, 3,5%, 4%, 5% (w/v) sinh khối các loại tảo khô. Lấy mẫu theo ngày trong 5 ngày liên tiếp và kiểm tra mật độ vi khuẩn theo phương pháp nêu ở mục 2.2.9 và kiểm tra hàm lượng axit lactic theo phương pháp ở mục 2.2.5.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính enzym ngoại bào.

Khả năng sinh enzym ngoại bào của các chủng vi khuẩn thử nghiệm được xác định thông qua phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [59]. Chuẩn bị đĩa môi trường thạch (1% agar) có bổ sung cơ chất tinh bột (1%), casein (0,1%) và carboxymethyl cellulose (CMC) (1%) tương ứng cho enzym amylase, protease, cellulase. Lấy 1 mL dịch vi khuẩn nuôi đến mật độ 10^7 CFU/mL vào các ống Effendoft, ly tâm 9000 vòng/phút trong 2 phút, sau đó đục lỗ thạch rồi bổ sung riêng biệt vào từng lỗ thạch các dung dịch như sau: 100 μ L dịch vi khuẩn, 100 μ L dịch môi trường dùng để nuôi vi khuẩn (đối chứng âm). Các đĩa được nuôi tĩnh trong tủ nuôi qua đêm ở 35°C sau đó nhuộm màu với thuốc thử Lugol 1% để xác định khả năng sinh enzym ngoại bào thông qua đường kính vòng phân giải.

$$\text{Kích thước vòng phân giải (mm)} = D - d$$

(D là đường kính vòng thủy phân; d: đường kính lỗ thạch).

2.2.4. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus*.

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch [59]. Chủng nghiên cứu được nuôi ở 35°C trong 24 giờ, ly tâm loại tế bào và thu dịch nuôi cấy. Chủng vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* cũng được nuôi ở 35°C trong 24 giờ. Chuẩn bị đĩa thạch môi trường MPA có chứa chủng gây bệnh bằng cách trang 100 μ L dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mật độ 10^5 lên bề mặt môi trường sau đó đục lỗ thạch. Nhỏ 100 μ L dịch ly tâm của chủng nghiên cứu vào các lỗ thạch đó. Sau 24h nuôi tĩnh ở 35°C, quan sát sự tạo thành của vòng kháng khuẩn. Nếu trên mặt thạch xuất hiện vòng kháng khuẩn hoặc nhận thấy sự sinh trưởng cạnh tranh của các chủng vi khuẩn có lợi thử nghiệm, chứng tỏ chúng có hoạt tính kháng khuẩn hoặc cạnh tranh sinh trưởng với chủng vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus*.

Kích thước vòng kháng khuẩn (mm) = D - d
(D là đường kính vòng kháng khuẩn; d: đường kính lỗ thạch).

2.3.5. Xác định hàm lượng axit lactic trong môi trường

Thu mẫu dịch sinh khối vi khuẩn, ly tâm ở 9000 vòng/phút trong 2 phút loại cặn và sử dụng dịch thu được để kiểm tra hàm lượng axit lactic sinh ra. Cụ thể, dung dịch NaOH 0,1 N được sử dụng để chuẩn độ dịch khuẩn sau ly tâm. Bổ sung phenolphthalein làm chất chỉ thị màu trong quá trình chuẩn độ. Dựa vào lượng NaOH sử dụng để xác định hàm lượng axit lactic, với quy ước, 1 mL NaOH (0,1N) sử dụng tương đương với 9,008 mg axit lactic [60].

- **Ảnh hưởng của nguồn cacbon:** Sử dụng lần lượt các nguồn cacbon khác nhau như fructose, saccharose, glucose và mật rỉ đường với nồng độ 2 g/L để bổ sung vào môi trường chứa sinh khối tảo khô. Bổ sung dịch nuôi sinh khối vi khuẩn vào các môi trường đã chuẩn bị. Sau 4 ngày nuôi cấy, tiến hành đánh giá khả năng sinh axit lactic của vi khuẩn nghiên cứu.

2.3.6. Đánh giá khả năng tồn tại của vi khuẩn tuyển chọn trong một số điều kiện cực trị [61]

- Khảo sát khả năng chịu mặn

Các chủng vi khuẩn nghiên cứu được nuôi trong môi trường MPA/MRS hoặc môi trường chứa sinh khối tảo có bổ sung NaCl với nồng độ khác nhau (0; 1,5; 2; 3; 4%) ở 35 °C. Sau 2 ngày nuôi cấy, so sánh khả năng sinh trưởng của chúng khi tồn tại trong môi trường MPA và môi trường chứa sinh khối tảo trong các độ mặn khác nhau này.

- Khảo sát khả năng chịu sốc nhiệt

Các chủng vi khuẩn nghiên cứu được nuôi trong môi trường MPA/MRS hoặc môi trường chứa sinh khối tảo đến mật độ vi khuẩn đạt 10^8 CFU/mL. Sau đó, dịch nuôi vi khuẩn này được chuyển sang ống Eppendorf và đặt trong bể nước ở các nhiệt độ 40, 45 và 50 °C trong 15 phút, ngay sau đó được đưa vào bể chứa đá để sốc nhiệt trong 5 phút rồi tiến hành xác định mật độ tế bào sống sót của vi khuẩn lựa chọn.

- Khảo sát khả năng chịu pH axit

Các chủng vi khuẩn có lợi lựa chọn được nuôi trong môi trường MPA/MRS hoặc môi trường chứa sinh khối tảo đến mật độ vi khuẩn đạt 10^8 CFU/mL. Sau đó, dịch nuôi vi khuẩn này được chuyển sang ống Eppendorf và ly tâm 9000 vòng/phút trong 2 phút để loại bỏ phần dịch nổi phía trên. Phần sinh khối còn lại được đồng

nhất cùng dịch môi trường MPA hoặc môi trường chứa sinh khối tảo ở các pH khác nhau: 1, 2 và 3 bằng cách chuẩn độ với HCL 1N. Phần dịch này được nuôi ở 35 °C trong các khoảng thời gian 1, 2 và 3 giờ. Sau đó, các mẫu này được ly tâm ở 9000 vòng/phút trong 2 phút, loại dịch, thu sinh khối. Sinh khối này được hòa tan lại trong dung dịch đệm photphat (pH 7) sau đó pha loãng để xác định mật độ vi khuẩn.

2.2.7. Phương pháp xác định chỉ số prebiotic

Chỉ số prebiotic (Prebiotic index – I_{preb}) được xác định dựa trên mô tả bởi Palframan và cộng sự [46]. Trong đó, dịch vi khuẩn probiotic nuôi qua đêm trong môi trường MPA được ly tâm để thu sinh khối. Sinh khối từng chủng vi khuẩn được rửa và hòa tan lại bằng nước cất khử trùng trước khi được chuyển riêng rẽ vào môi trường MT1 (môi trường cơ bản + glucose 1%) và MT2 (môi trường cơ bản + *S. platensis* 1%) với tỷ lệ 10% và nuôi lắc ở 35 °C. Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi được đánh giá bằng phương pháp xác định mật độ tế bào ở mục 2.3.9.

Chỉ số prebiotic được tính toán theo công thức:

$$I_{preb} = \frac{\text{Giá trị mật độ } \frac{CFU}{ml} \text{ của probiotic trong MT2}}{\text{Giá trị mật độ } \frac{CFU}{ml} \text{ của probiotic trong MT1}}$$

Chỉ số hoạt động của prebiotic (Prebiotic activity score – A_{preb}) được xác định theo phương pháp được đề cập bởi Huebner và cộng sự [62]. Trong phương pháp này, bên cạnh vi khuẩn probiotic, vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* cũng được nuôi trên môi trường MT1 và MT2. Giá trị mật độ vi khuẩn probiotic và *V. parahaemolyticus* tại thời điểm 0 và sau 24 giờ nuôi cấy được xác định theo phương pháp tại mục 2.2.9 và sử dụng để tính toán giá trị A_{preb} bằng phương trình:

$$A_{preb} = \frac{(\text{Log}P_{24} - \text{Log}P_0)_{MT2}}{(\text{Log}P_{24} - \text{Log}P_0)_{MT1}} - \frac{(\text{Log}V.p_{24} - \text{Log}V_0)_{MT2}}{(\text{Log}V.p_{24} - \text{Log}V_0)_{MT1}}$$

Trong đó: LogP là giá trị logarit CFU/mL của vi khuẩn probiotic tại 0 giờ (P_0) và sau 24 giờ (P_{24}) trên môi trường MT1 hoặc MT2. Tương tự, LogV là giá trị logarit CFU/mL của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tại 0 giờ (V_0) và sau 24 giờ (V_{24}) trên môi trường MT1 hoặc MT2.

2.2.8. Phân tích sắc ký khí (GC)

Chuẩn bị ba mẫu gồm: dịch sinh khối *L. acidophilus* LB nuôi cấy trong môi trường MRS, sinh khối tảo *S. platensis* và sinh khối *L. acidophilus* LB nuôi trong môi trường *S. platensis*. Tiến hành gửi mẫu phân tích các thành phần axit béo của ba mẫu này tại phòng thử nghiệm (Cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng), sử dụng

máy sắc ký khí 7890A từ Agilent, mẫu được tiêm vào các cột mao quản SBP-2331 (Sigma-Aldrich) và sử dụng heli làm khí mang (vận tốc tuyến tính 36,26 cm/s) [60].

2.2.9. Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn

Pha loãng mẫu đến các nồng độ khác nhau 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ,... Hút 100 μL dịch vi khuẩn pha loãng và nhỏ lên đĩa petri chứa môi trường thạch, trang đều để dung dịch trải hết khắp mặt thạch và nuôi ở 35 °C trong 24 giờ. Sau đó, mật độ được xác định qua phương pháp đếm khuẩn lạc thông thường

$$\text{Mật độ vi khuẩn (Log CFU/mL)} = \text{Log}_{10} \frac{\text{Số khuẩn lạc}}{\text{Hệ số pha loãng} \times \text{thể tích mẫu hút (mL)}}$$

2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phương pháp xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Microsoft Excel 2016: tính toán kết quả trung bình của các kết quả thí nghiệm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy sai số.

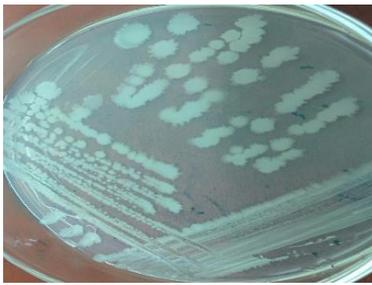
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh các enzym ngoại bào, kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh đường ruột trên tôm thẻ chân trắng.

3.1.1. Quan sát đặc điểm hình thái

Bộ chủng giống vi khuẩn có lợi của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường được phân lập từ các mẫu ruột tôm, có khả năng sinh các enzym ngoại bào và kháng khuẩn, đặc biệt hữu ích trong phát triển sản phẩm probiotic và ứng dụng cho nuôi trồng thủy sản. Trong đó có 4 chủng vi khuẩn ký hiệu P1, P2, P3 và P4 có đặc điểm hình thái khuẩn lạc hoàn toàn khác nhau nên nhận định ban đầu chúng là những chủng khác nhau và được tiến hành đánh giá lại khả năng sinh enzym ngoại bào và ức chế vi khuẩn gây bệnh của chúng (Bảng 3.1).

Bảng 3.1: Đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Chủng	Hình thái khuẩn lạc	Đặc điểm hình thái
P1		Khuẩn lạc hình cầu, viền dày, mép răng cưa, màu trắng đục, đường kính 2-3 mm.
P2		Khuẩn lạc dẹt, không nhân, viền mép tua rua, màu trắng đục, đường kính 4-5 mm.
P3		Khuẩn lạc có nhân, viền mỏng, bóng, nhợt, màu trắng ngà, đường kính 4 mm.

P4		Khuẩn lạc dẹt, không nhân, hơi lốm giỡn, nhớt, màu trắng ngà, đường kính 3 mm.
----	---	--

3.1.2. Đánh giá hoạt tính sinh enzym ngoại bào và ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

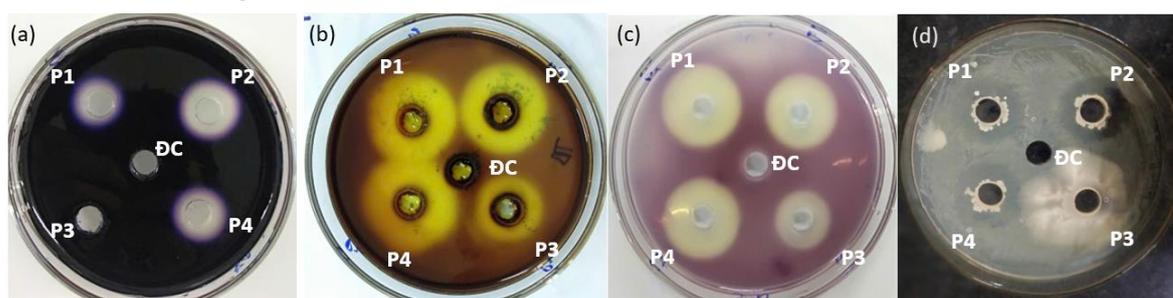
Bốn chủng vi khuẩn P1, P2, P3 và P4 được nuôi trong dịch môi trường MPA ở 35 °C. Sau 24 giờ nuôi cấy, phân dịch nổi thu được sau ly tâm được bổ sung vào các đĩa thạch chứa các cơ chất như tinh bột, casein, CMC hoặc đĩa trang dịch vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus*, quan sát các vòng phân giải tạo thành.

Bảng 3.2: Hoạt tính sinh enzym ngoại bào và ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của các chủng nghiên cứu

Chủng giống	Đường kính vòng phân giải cơ chất (D-d, mm)			Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)
	Amylase	Protease	Cellulase	
P1	8 ± 1,0	16 ± 1,0	17 ± 1,0	7 ± 1,0
P2	11 ± 1,0	18 ± 1,0	14 ± 1,0	9 ± 1,0
P3	-	13 ± 0,8	12 ± 1,0	-
P4	9 ± 1,0	20 ± 1,0	18 ± 1,0	9 ± 1,0

Kết quả nhận được từ Bảng 3.2 cho thấy, 4 chủng vi khuẩn nghiên cứu đều thể hiện được hoạt tính sinh enzym ngoại bào hoặc ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Trong đó, chủng P3 có hoạt tính sinh học yếu nhất, còn các chủng P1, P2 và P4 có hoạt tính sinh enzym ngoại bào và kháng *V. parahaemolyticus* tốt hơn. Đường kính vòng phân giải tinh bột của chủng P2 đạt kích thước rộng nhất là 11 mm. Các chủng P1, P2 và P4 có hoạt tính sinh enzym protease và cellulase xấp xỉ nhau, nằm trong khoảng từ 18 – 20 mm. Riêng chủng P3 không có khả năng phân giải tinh bột, hoạt tính phân giải casein (protein) và CMC (cellulase) cũng thấp hơn 3 chủng còn lại (12 - 13 mm). Khi tiến hành đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus*, 3 trong số 4 chủng nghiên cứu có khả năng kháng lại chủng vi khuẩn gây bệnh này, với đường kính vòng kháng khuẩn của chủng P1, P2, P4 lần lượt là 7, 9 và 9 mm. Chủng P3 không

thể hiện khả năng ức chế *V. parahaemolyticus*.



Hình 3.1: Vòng hoạt tính của các chủng vi khuẩn nghiên cứu

(a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) vòng kháng *V. parahaemolyticus*

3.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu trong môi trường chứa tảo.

3.2.1. Ảnh hưởng của loại tảo và nồng độ tảo đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn nghiên cứu.

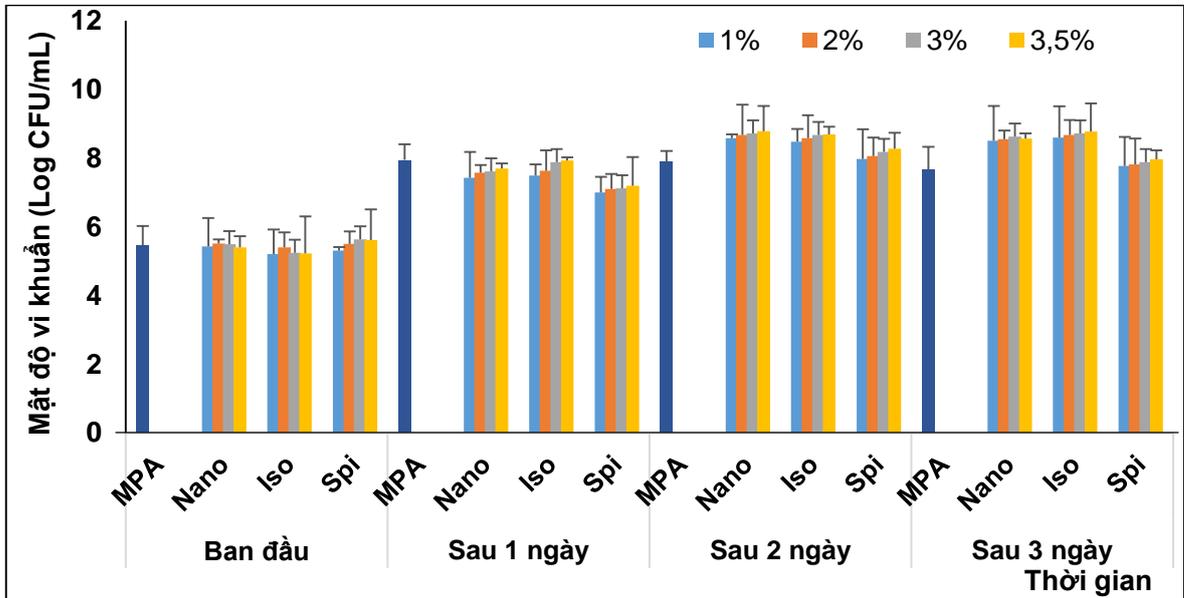
Hiện nay, trong nuôi thủy sản, vi khuẩn có lợi được sử dụng phổ biến để bổ sung vào chế độ ăn giúp vật nuôi chống lại các bệnh liên quan đến rối loạn tiêu hóa, đường ruột bởi khả năng sinh ra các enzym và hợp chất kháng khuẩn tốt [63]. Nhu cầu sử dụng sinh khối của nhóm vi khuẩn này ngày càng tăng để góp phần giảm thiểu lượng kháng sinh tổng hợp sử dụng mà vẫn giúp ngăn ngừa sự lây lan của vi khuẩn gây bệnh. Tuy nhiên, chất lượng và chi phí trong sản xuất probiotic phụ thuộc rất nhiều vào chủng giống vi sinh vật, điều kiện nuôi và thành phần môi trường lên men. Vì vậy, việc nghiên cứu lựa chọn được một loại cơ chất phù hợp thay thế cho các thành phần dinh dưỡng phức tạp vẫn thường được sử dụng trong môi trường lên men, mà vẫn giúp kích thích sinh hoạt chất sinh học cũng như làm tăng mật độ của vi sinh vật có lợi trong quá trình sản xuất probiotic là điều cần thiết.

Trong nghiên cứu này, sinh khối của các loại tảo gồm: *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* (ký hiệu trong các hình vẽ tương ứng là Spi, Nano, Iso) sau khi thu hoạch được sấy khô và nghiền thành bột để sử dụng làm nguồn dinh dưỡng chính trong cho sinh trưởng của các chủng vi khuẩn có lợi. Các nồng độ khác nhau của từng loại tảo (1, 2, 3 và 3,5% (w/v)) được hòa riêng rẽ trong dung dịch đệm PBS để làm môi trường nhân nuôi vi khuẩn. Thông qua kết quả đánh giá sinh trưởng sẽ sàng lọc được loại tảo và hàm lượng phù hợp cho sinh trưởng của vi khuẩn nghiên cứu.

❖ Sinh trưởng của chủng P1 trong môi trường MPA và các môi trường tảo:

Kết quả thu được từ Hình 3.2 cho thấy, sinh trưởng của chủng P1 khi được nuôi cấy trong môi trường chứa tảo đạt mật độ tương đương so với môi trường

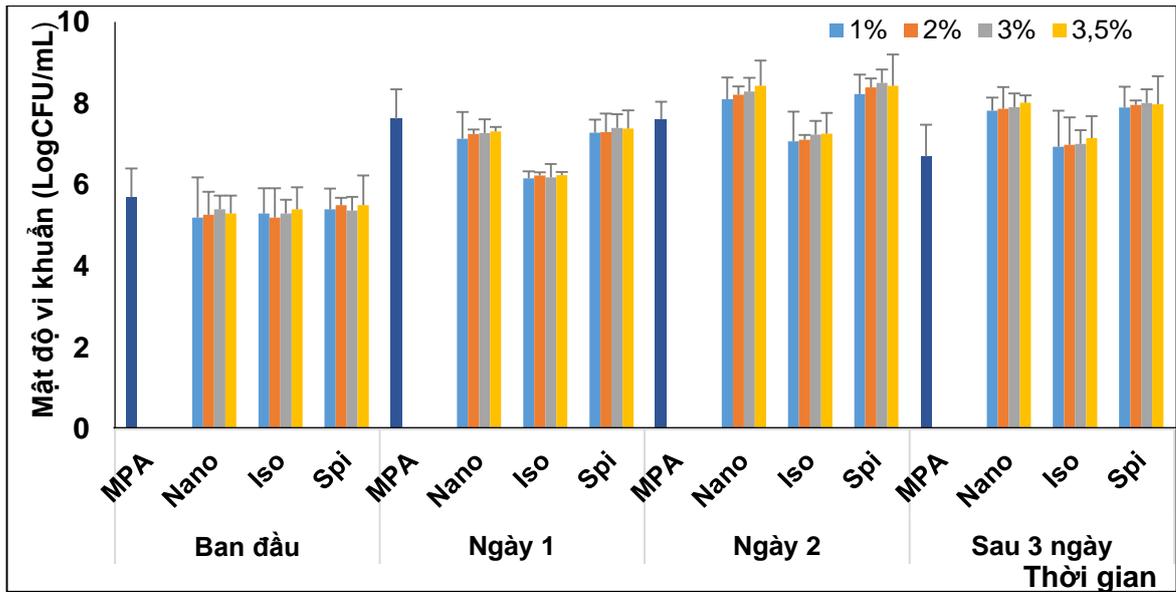
MPA. Vi khuẩn có mật độ cao nhất sau 2 ngày nuôi cấy, đạt trên 10^8 CFU/mL ở các môi trường chứa tảo thử nghiệm. Cụ thể, môi trường chứa 1% tảo *N. oculata* hoặc *I. galbana* đạt mật độ vi khuẩn lần lượt là 8,57 và 8,43 Log CFU/mL, cao hơn so với môi trường chứa *S. platensis*. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ tảo bổ sung từ 1 đến 3,5% không làm thay đổi đáng kể số lượng vi khuẩn trong môi trường.



Hình 3.2: Mật độ vi khuẩn của chủng P1 sinh trưởng trong các môi trường tảo

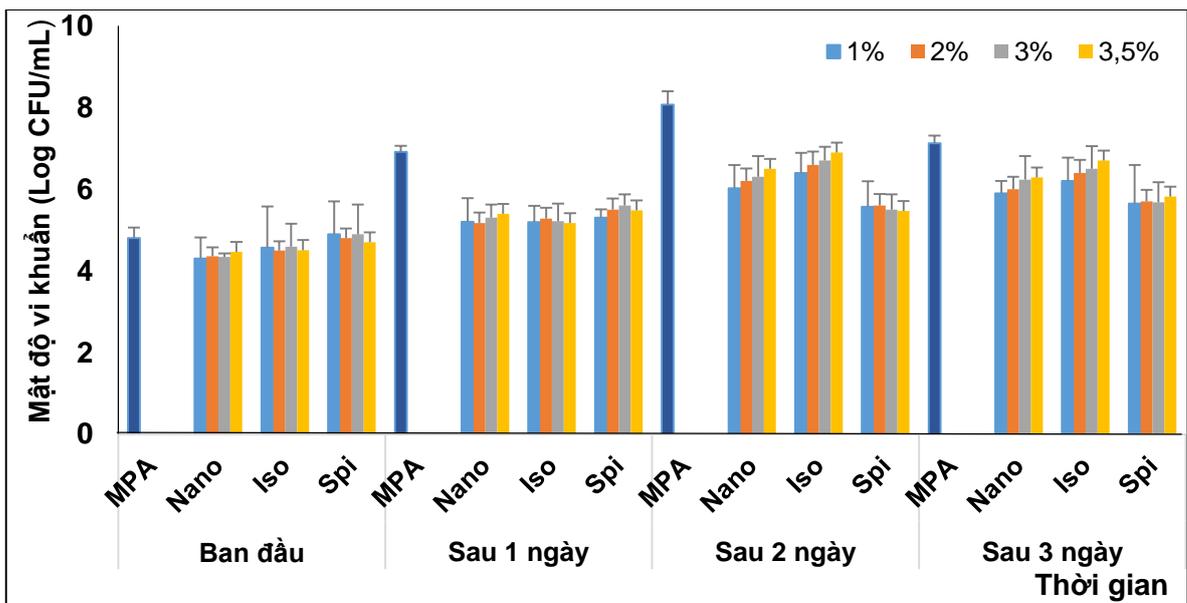
❖ *Sinh trưởng của chủng P2 trong môi trường MPA và các môi trường tảo:*

Môi trường tảo *N. oculata* và *S. platensis* có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng của chủng P2 với mật độ vi khuẩn đạt lần lượt là 8,29 và 8,5 Log CFU/mL ở ngày thứ 2, cao hơn so với khi được sinh trưởng trong môi trường MPA. Nghiên cứu cũng cho thấy *I. galbana* không phải là môi trường thích hợp để nuôi cấy chủng P2, giá trị mật độ vi khuẩn thu được chỉ đạt 7,4 Log CFU/mL (Hình 3.3).



Hình 3.3: Mật độ vi khuẩn của chủng P2 sinh trưởng trong các môi trường tảo

❖ Sinh trưởng của chủng P3 trong môi trường MPA và các môi trường tảo:

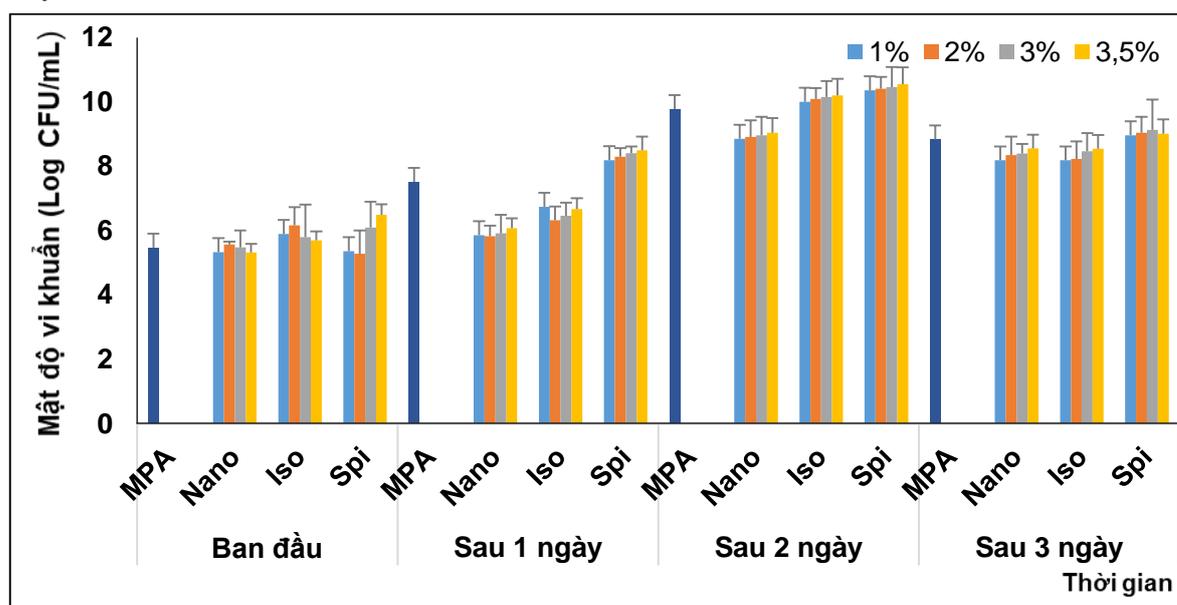


Hình 3.4: Mật độ vi khuẩn của chủng P3 sinh trưởng trong các môi trường tảo

Hình 3.4 cho thấy, 3 loại sinh khối tảo nghiên cứu không phải là nguồn dinh dưỡng phù hợp sử dụng làm môi trường để nhân nuôi chủng P3, vì khả năng sinh trưởng của chúng trong môi trường chứa tảo này luôn thấp hơn so với khi sinh trưởng trong môi trường MPA. Cụ thể, mật độ vi khuẩn thu được sau 2 ngày lên men đạt cao nhất ở môi trường tảo *I. galbana* đạt 6,9 Log CFU/mL trong khi ở môi trường MPA tại cùng thời điểm đạt 8,07 Log CFU/mL. Điều này chứng tỏ, không phải tảo là môi trường phù hợp cho tất cả các chủng vi khuẩn sinh trưởng. Nghiên cứu của Kaga và cộng sự cũng chỉ ra điều này [58].

❖ *Sinh trưởng của chủng P4 trong môi trường MPA và các môi trường tảo:*

Số liệu trong Hình 3.5 cho thấy, kết quả sinh trưởng của chủng P4 môi trường chứa tảo tương tự với chủng P2. Mật độ vi khuẩn tăng dần theo thời gian nuôi cấy và đạt cao nhất ở ngày thứ 2 khi được nuôi trong môi trường chứa 1% (w/v) tảo *I. galbana* hay *S. platensis* với giá trị mật độ là 10,15 và 10,41 Log CFU/mL cao hơn so với môi trường MPA. Khi thay thế 2 loại tảo này bằng *N. oculata* thì mật độ vi khuẩn thu được giảm xuống 8,86 Log CFU/mL ở ngày nuôi cấy thứ 2.



Hình 3.5: Mật độ vi khuẩn của chủng P4 sinh trưởng trong các môi trường tảo

Nhiều nghiên cứu cho thấy, trong sinh khối tảo khô có chứa nhiều thành phần dinh dưỡng như protein, axit amin tự do, các vitamin và khoáng chất cũng như thành phần prebiotic có tác dụng kích thích sinh trưởng cho vi khuẩn probiotic [64]. Trong nghiên cứu của chúng tôi kết quả thí nghiệm cũng chỉ ra rằng việc sử dụng sinh khối tảo khô 1% (w/v) thay thế cho môi trường MPA không làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn có lợi thử nghiệm. Đồng thời việc tăng nồng độ tảo sử dụng không làm thay đổi đáng kể số lượng vi khuẩn thu được trong dịch nuôi. Bên cạnh đó, mỗi chủng vi khuẩn lại sinh trưởng tốt trong các môi trường tảo khác nhau. Vì vậy, các môi trường tảo 1% sẽ tiếp tục được thử nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của chúng đến hoạt tính probiotic của vi khuẩn, từ đó có thể lựa chọn được loại tảo phù hợp sử dụng trong nhân nuôi các chủng vi khuẩn, có tác dụng kích thích sinh trưởng và hoạt tính có lợi của vi khuẩn.

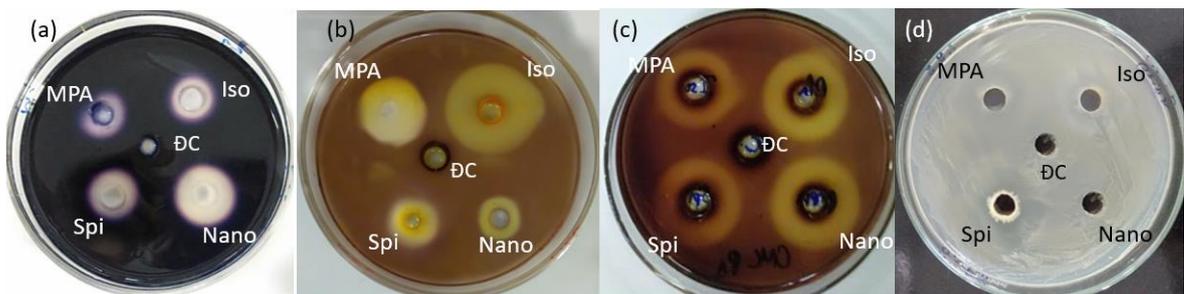
3.2.2. Ảnh hưởng của môi trường chứa tảo đến hoạt tính sinh enzyme ngoại bào và ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn nghiên cứu

Bên cạnh khả năng sinh trưởng, trong nghiên cứu này, hoạt tính sinh enzyme ngoại bào (amylase, protease, cellulase) và khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn có lợi khi được nuôi cấy riêng rẽ trong ba môi trường 1% sinh khối tảo *I. galbana*, *S. platensis* hay *N. oculata* đã được đánh giá.

❖ *Hoạt tính sinh học của chủng P1 trong môi trường MPA và các môi trường tảo:*

Bảng 3.3: Hoạt tính sinh học của chủng P1 trong các môi trường

Môi trường	Đường kính vòng hoạt tính (D-d, mm)			
	Amylase	Protease	Cellulase	Kháng khuẩn
MPA	8 ± 1,0	16 ± 1,0	17 ± 1,0	7 ± 1,0
<i>I. galbana</i> + PBS	7 ± 1,0	19 ± 1,0	19 ± 1,0	7 ± 1,0
<i>N. oculata</i> + PBS	13 ± 1,0	12 ± 1,0	20 ± 1,0	-
<i>S. platensis</i> + PBS	9 ± 1,0	13 ± 1,0	20 ± 1,0	6 ± 1,0



Hình 3.6: Hoạt tính sinh học của chủng P1 trong các môi trường

(a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) vòng kháng *V. parahaemolyticus*

Kết quả từ Bảng 3.3 và Hình 3.6 cho thấy, chủng P1 khi sinh trưởng trong môi trường tảo *N. oculata* cho hoạt tính sinh enzyme amylase tốt nhất với đường kính vòng phân giải tinh bột đạt 13 mm, cao hơn cả khi được nuôi cấy trong môi trường MPA (8 mm) hoặc các môi trường tảo *S. platensis* (9 mm) và *I. galbana* (7 mm). Kết quả này cho thấy môi trường tảo *N. oculata* có thể đã kích thích khả năng sinh enzyme amylase của chủng P1. Trong khi đó, môi trường tảo *I. galbana* có ảnh hưởng tích cực đến hoạt tính sinh protease của chủng P1, với đường kính vòng phân giải casein thu được đạt 19 mm, cao hơn so với khi nuôi trong môi trường MPA (16 mm). Bên cạnh đó, hoạt tính sinh cellulase của chủng P1 cũng cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các môi trường. Môi trường *N. oculata* và *S. platensis* có vòng phân giải enzyme cellulase cao nhất, với đường kính thu được đều đạt 20 mm, trong khi *I. galbana* đạt 19 mm. Tất cả các môi trường tảo này đều vượt trội hơn so với MPA

(17 mm), cho thấy sự gia tăng hoạt tính cellulase khi vi khuẩn được nuôi trong các môi trường tảo.

Về khả năng kháng khuẩn, chủng P1 khi nuôi trong môi trường *I. galbana* có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* tốt nhất, với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 7 mm, tương đương với môi trường MPA (7 mm). Môi trường *S. platensis* cũng có khả năng kháng khuẩn, nhưng ở mức độ thấp hơn (6 mm). Đáng chú ý, vi khuẩn nuôi trong môi trường *N. oculata* không thể hiện khả năng kháng khuẩn.

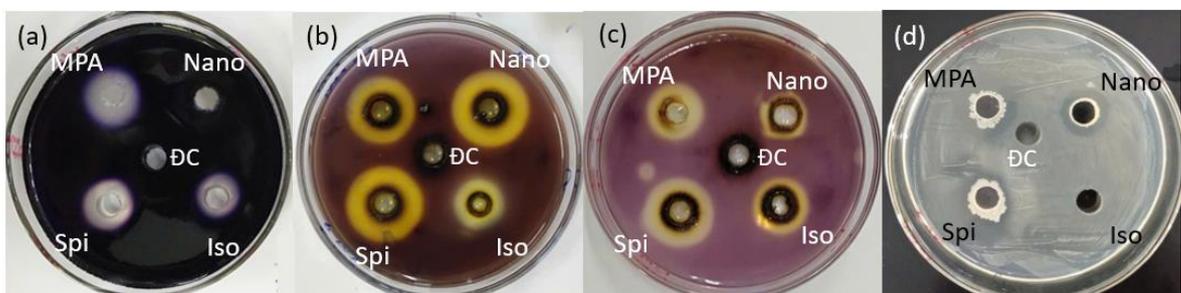
Dựa trên kết quả đã được trình bày, môi trường tảo *N. oculata* là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của chủng P1 trong việc kích thích hoạt tính amylase và cellulase - hai loại enzym quan trọng trong quá trình tiêu hóa, trong khi *I. galbana* lại hiệu quả hơn trong việc thúc đẩy hoạt tính Protease và khả năng kháng *V. parahaemolyticus*.

❖ *Hoạt tính sinh học của chủng P2 trong môi trường MPA và các môi trường tảo:*

Ảnh hưởng của môi trường MPA và các môi trường tảo gồm: *I. galbana*, *S. platensis*, *N. oculata* đến hoạt tính enzym ngoại bào (amylase, protease, cellulase) và khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của chủng P2 được trình bày trong Bảng 3.4 và Hình 3.7.

Bảng 3.4: Hoạt tính sinh học của chủng P2 trong các môi trường

Môi trường	Đường kính vòng hoạt tính (D-d, mm)			
	Amylase	Protease	Cellulase	Kháng khuẩn
MPA	11 ± 1,0	18 ± 1,0	14 ± 1,0	9 ± 1,0
<i>I. galbana</i> + PBS	7 ± 1,0	9 ± 1,0	11 ± 1,0	-
<i>N. oculata</i> + PBS	-	19 ± 1,0	10 ± 1,0	11 ± 1,0
<i>S. platensis</i> + PBS	9 ± 1,0	20 ± 1,0	16 ± 1,0	16 ± 1,0



Hình 3.7: Hoạt tính sinh học của chủng P2 trong các môi trường

(a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) vòng kháng *V. parahaemolyticus*

Kết quả cho thấy, đối với hoạt tính amylase, vi khuẩn P2 nuôi trong môi trường *S. platensis* cho hoạt tính cao nhất, với đường kính vòng phân giải tinh bột đạt 9 mm, cao hơn so với *I. galbana* (7 mm) và gần bằng với môi trường MPA (11 mm). Ngoài ra, chủng P2 khi nuôi trong môi trường tảo *N. oculata* không có hoạt tính sinh enzym amylase. Về hoạt tính protease, chủng P2 nuôi trong môi trường *S. platensis* tiếp tục cho kết quả cao nhất với đường kính vòng phân giải casein đạt 20 mm, vượt qua cả MPA (18 mm) và các môi trường khác. *N. oculata* cũng cho thấy hoạt tính protease cao (19 mm), trong khi *I. galbana* có hoạt tính protease thấp nhất (9 mm). Hoạt tính enzym cellulase của chủng P2 trong môi trường *I. galbana* và *N. oculata* tương đương nhau, đạt lần lượt 11 mm và 10 mm, thấp hơn so với MPA (14 mm).

Chủng P2 có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* một cách vượt trội khi được nuôi trong môi trường *S. platensis* với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 16 mm, cao hơn đáng kể so với môi trường MPA (9 mm) và *N. oculata* (11 mm). Trong khi đó, *I. galbana* không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn.

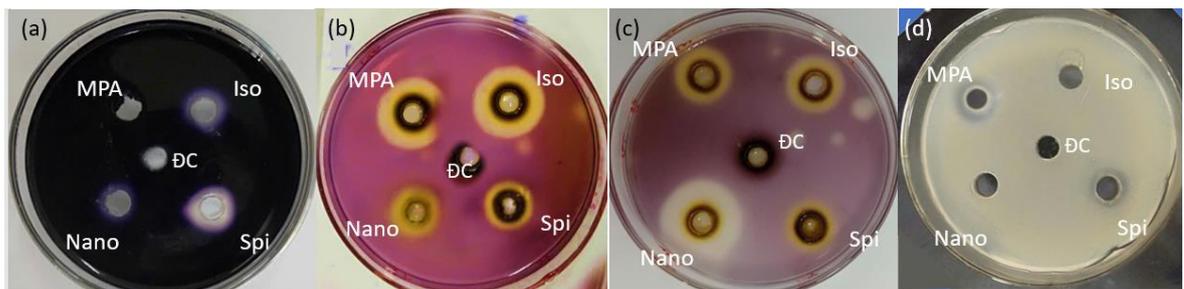
Từ kết quả nghiên cứu, có thể kết luận rằng môi trường chứa *S. platensis* là thích hợp nhất để tăng cường hoạt tính enzym ngoại bào (amylase, protease, cellulase) và ức chế *V. parahaemolyticus* của vi khuẩn. Đây là môi trường duy nhất thể hiện sự vượt trội ở các chỉ tiêu so với môi trường MPA và các môi trường tảo khác. *N. oculata* cũng cho thấy hiệu quả trong việc cải thiện hoạt tính protease ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus*. *I. galbana* thể hiện hoạt tính enzym ngoại bào ở mức trung bình và không có hoạt tính kháng khuẩn, cho thấy đây không phải là loại tảo phù hợp để nuôi cấy chủng P2.

❖ *Hoạt tính sinh học của chủng P3 trong môi trường MPA và các môi trường tảo:*

Nghiên cứu về hoạt tính sinh học của chủng P3 khi được nuôi trong môi trường MPA và các môi trường tảo khác nhau, kết quả cho thấy môi trường *S. platensis* là môi trường duy nhất kích thích sự sản sinh amylase, với đường kính vòng phân giải tinh bột đạt 5 mm. *I. galbana* và MPA có hoạt tính sinh enzym protease xấp xỉ nhau (13 mm), cao hơn so với *N. oculata* và *S. platensis* có vòng phân giải đạt lần lượt là 7 mm và 9 mm. Về hoạt tính cellulase, *N. oculata* vượt trội hơn cả với đường kính vòng hoạt tính đạt 16 mm, cao hơn đáng kể so với các môi trường khác và MPA. Điều này cho thấy *N. oculata* có tiềm năng hỗ trợ mạnh mẽ cho sự sản sinh enzym này. Khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn chỉ thể hiện trong hai môi trường MPA và *S. platensis* với đường kính vòng kháng khuẩn thu được lần lượt là 7 mm và 5 mm. Môi trường *I. galbana* và *N. oculata* không thể hiện khả năng kháng khuẩn. (Bảng 3.5 và Hình 3.8).

Bảng 3.5: Hoạt tính sinh học của chủng P3 trong các môi trường

Môi trường	Đường kính vòng hoạt tính (D-d, mm)			
	Amylase	Protease	Cellulase	Kháng khuẩn
MPA	-	13 ± 1,0	12 ± 1,0	7 ± 1,0
<i>I. galbana</i> + PBS	-	13 ± 1,0	13 ± 1,0	-
<i>N. oculata</i> + PBS	-	7 ± 1,0	16 ± 1,0	-
<i>S. platensis</i> + PBS	5 ± 1,0	9 ± 1,0	11 ± 1,0	5 ± 1,0

**Hình 3.8:** Hoạt tính sinh học của chủng P3 trong các môi trường tảo

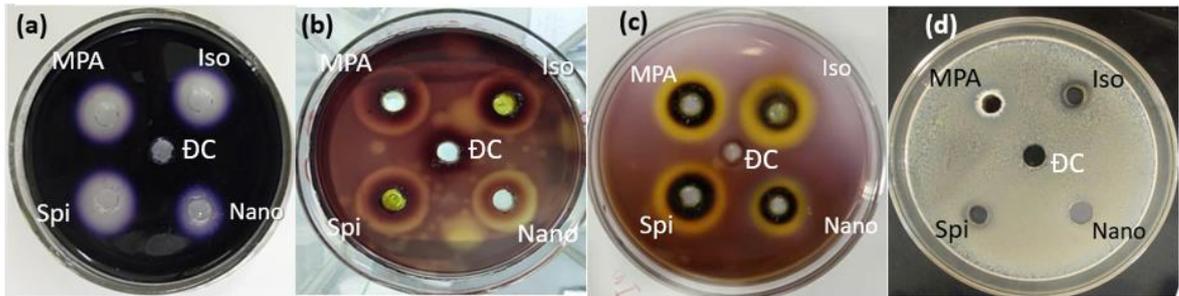
(a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) vòng kháng *V. parahaemolyticus*

❖ *Hoạt tính sinh học của chủng P4 trong môi trường MPA và các môi trường tảo:*

Từ kết quả thu được ở Bảng 3.6 và Hình 3.9 cho thấy, *S. platensis* là môi trường thích hợp nhất với hoạt tính sinh amylase và protease của vi khuẩn P4, đồng thời cũng có khả năng hỗ trợ kháng khuẩn. Cụ thể, kích thước vòng phân giải cơ chất tinh bột, casein và CMC lần lượt là 10, 21, 18 mm, cao hơn so với khi chúng sinh trưởng trong môi trường MPA. Bên cạnh đó, môi trường tảo *I. galbana* cũng cho thấy hoạt tính sinh enzyme ngoại bào tốt tương đương với môi trường tảo *S. platensis* và môi trường MPA, nhưng khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* lại thấp hơn (7 mm). Khi nuôi chủng P4 trong tảo *N. oculata*, không thể hiện khả năng kháng khuẩn, đồng thời hoạt tính sinh các enzyme amylase và cellulase kém hơn các môi trường còn lại.

Bảng 3.6: Hoạt tính sinh học của chủng P4 trong các môi trường

Môi trường	Đường kính vòng hoạt tính (D-d, mm)			
	Amylase	Protease	Cellulase	Kháng khuẩn
MPA	9 ± 1,0	20 ± 1,0	18 ± 1,0	9 ± 1,0
<i>I. galbana</i> + PBS	9 ± 1,0	20 ± 1,0	19 ± 1,0	7 ± 1,0
<i>N. oculata</i> + PBS	5 ± 1,0	18 ± 1,0	16 ± 1,0	-
<i>S. platensis</i> + PBS	10 ± 1,0	21 ± 1,0	18 ± 1,0	8 ± 1,0



Hình 3.9: Hoạt tính sinh học của chủng P4 trong các môi trường

(a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) vòng kháng *V. parahaemolyticus*

Như vậy, trong bốn chủng vi khuẩn probiotic thử nghiệm chỉ có ba chủng P1, P2 và P4 phù hợp để nhân nuôi trong môi trường chứa tảo. Các môi trường này có ảnh hưởng tích cực hay tiêu cực đến khả năng sinh trưởng và hoạt tính sinh học của vi khuẩn nghiên cứu còn tùy thuộc vào loại môi trường và chủng vi sinh vật nuôi cấy. Cụ thể:

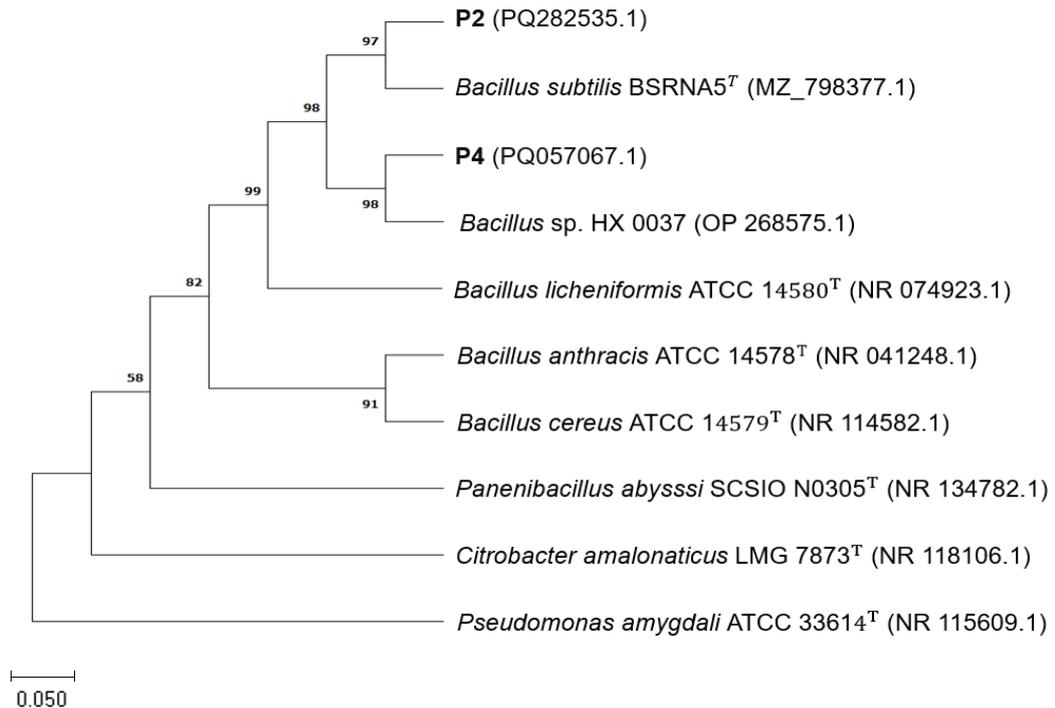
- Chủng P1 cho thấy tiềm năng sử dụng tảo *I. galbana* và *N. oculata* làm môi trường dinh dưỡng;

- Chủng P2 và P4 có hoạt tính sinh học tốt hơn so với chủng P1 khi được nuôi cấy trong môi trường chứa tảo. Trong đó, chủng P4 có khả năng sử dụng cả 3 loại môi trường tảo thử nghiệm, nhưng chủng P2 chỉ phù hợp nhân nuôi trong môi trường chứa *S. platensis* hoặc *N. oculata*.

Tảo *S. platensis* thường có giá thành rẻ và dễ thu hồi sinh khối hơn so với vi tảo *I. galbana*/*N. oculata* – loại tảo có kích thước nhỏ, sản lượng thấp. Do vậy khi xét đến khả năng kích thích sinh trưởng và chi phí sử dụng trong quá trình sản xuất, chúng tôi lựa chọn tảo *S. platensis* là phù hợp để thay thế môi trường MPA trong nhân nuôi 2 chủng vi khuẩn P2 và P4 để giúp tiết kiệm chi phí và nâng cao tính khả thi của đề tài.

3.3. Định danh các chủng vi khuẩn lựa chọn

Hai chủng vi khuẩn ký hiệu P2 và P4 đã được lựa chọn để xác định vị trí phân loại của nó bằng gen 16S rRNA. DNA tổng số được tách từ chủng P2 và P4 để nhân đoạn gen 16S rRNA bằng cặp mồi 27F/1492R, kết quả là đã khuếch đại được đoạn gen 16S rRNA đặc hiệu có kích thước khoảng 1500 bp. Trình tự gen của hai chủng P2 và P4 sau khi giải trình tự được so sánh đối chiếu với dữ liệu nguồn gen và phân tích bằng BLAST trên GeneBank (NCBI), từ đó xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA6 (Hình 3.10).



Hình 3.10: Cây phát sinh loài của chủng P2 và P4

Kết quả phân tích và so sánh trình tự 16S rRNA với các trình tự gen công bố trên GenBank cho thấy, hai chủng vi khuẩn P2 và P4 đều thuộc chi *Bacillus*, chủng P2 có độ tương đồng 99,09% với chủng *Bacillus subtilis* BSRNA5 (MZ_798377.1), đặt tên là *Bacillus subtilis* P2 và được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số PQ282535.1. Chủng P4 tương đồng 98,89% với chủng *Bacillus* sp. (OP_268575.1), tạm gọi tên là *Bacillus* sp. P4 và được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số PQ057067.1.

Như vậy, các nghiên cứu trên đây đã cho thấy một số chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng sử dụng tảo làm môi trường nuôi cấy. Cả *Bacillus* và *Lactobacillus* đều là những probiotic được ứng dụng rộng rãi trong NTTS giúp hỗ trợ tiêu hóa, tăng cường hệ miễn dịch và ngăn chặn sự phát triển của các vi khuẩn có hại cho vật nuôi. Trong nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ tiếp tục đánh giá đặc tính sinh trưởng của *Lactobacillus* khi được nuôi cấy trong cùng điều kiện, nhằm hướng đến ứng dụng đa chủng trong chế tạo các sản phẩm sinh học phục vụ cho quá trình NTTS sau này.

3.4. Đánh giá đặc tính sinh học của chủng vi khuẩn *L. acidophilus* LB trong môi trường MRS và môi trường chứa tảo.

Hiện nay, các chế phẩm probiotic đơn chủng hay đa chủng đều được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi, nhưng các chế phẩm đa chủng có thể hữu ích hơn bởi được kết hợp giữa đặc tính sinh học của các chủng riêng lẻ. Các nghiên cứu *in vitro* cho

thấy một số chế phẩm probiotic đa chủng thể hiện tác dụng ức chế các mầm bệnh đường ruột tốt hơn so với các chế phẩm đơn chủng. Nuôi cấy đa chủng chế phẩm sinh học *Lactobacillus pentosus* BD6, *Lactobacillus fermentum* LW2 và *Bacillus subtilis* E20 cũng đã cải thiện sức khỏe và sản lượng tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cao hơn khi so với chế phẩm sinh học đơn chủng [65]. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi cũng đồng thời tiến hành đánh giá tác dụng có lợi của môi trường chứa tảo đến sinh trưởng và hoạt tính sinh học của chủng *Lactobacillus acidophilus* LB (sau đây gọi tắt là chủng LB). Thông qua đây có thể có thêm dẫn liệu về sự đa dạng của các chủng vi khuẩn có lợi khi được sinh trưởng trong môi trường chứa tảo, đồng thời có thể định hướng tạo ra chế phẩm sinh học probiotic đa chủng được lên men trên nền sinh khối tảo. Nếu như thành công sẽ tạo ra được chế phẩm sinh học đa chủng bổ sung vào thức ăn cho vật nuôi, vừa phát huy được hoạt tính sinh enzym ngoại bào, cải thiện khả năng sử dụng thức ăn từ các chủng *B. subtilis* P2 và *Bacillus* sp. P4, lại tạo ra axit lactic giúp tăng cường sự ức chế vi khuẩn gây bệnh nhờ chủng *L. acidophilus* LB và sản phẩm thu được có chứa thêm hàm lượng axit béo PUFA cần thiết cho vật nuôi thủy sản.

Vi khuẩn lactic thường được nhân nuôi trong môi trường MRS có chứa nhiều thành phần dinh dưỡng. Trong một số nghiên cứu thăm dò, khi nuôi LB trong môi trường chứa sinh khối tảo 1 và 2% không làm kích thích sinh trưởng của vi khuẩn, điều này có thể được giải thích bởi hàm lượng tảo này không cung cấp đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn (kết quả không thể hiện ở đây). Vậy nên, chúng tôi tiến hành nhân nuôi chủng LB trong các môi trường chứa tảo *S. platensis*, *N. oculata* hay *I. galbana* ở các nồng độ từ 3% đến 5% và so sánh với môi trường MRS. Tiến hành lấy mẫu để kiểm tra khả năng sinh trưởng và sinh axit lactic theo ngày bằng phương pháp nêu ở mục 2.3.5 và 2.3.9. Kết quả thu được sau 5 ngày theo dõi được chỉ ra trong Bảng 3.7.

Bảng 3.7: Mật độ vi khuẩn *L. acidophilus* trong môi trường nuôi cấy bổ sung các loại và nồng độ sinh khối tảo khác nhau (Log CFU/mL)

Nồng độ tảo (%)	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
	Mật độ vi khuẩn <i>L. acidophilus</i> LB trên MRS (Log CFU/mL)					
0	5,09 ± 0,23	6,32 ± 0,44	8,73 ± 0,17	10,26 ± 0,41	10,57 ± 1,16	8,39 ± 0,65
	Mật độ vi khuẩn <i>L. acidophilus</i> LB trên <i>I. galbana</i> + PBS (Log CFU/mL)					
3%	5,12 ± 0,51	5,82 ± 0,1	7,62 ± 0,2	8,88 ± 0,11	9,73 ± 0,41	8,03 ± 0,58
3.5%	5,34 ± 0,87	6,45 ± 0,1	7,94 ± 0,6	9,54 ± 0,83	9,99 ± 0,55	8,45 ± 1,66

4%	5,84 ± 0,98	6,69 ± 0,50	8,13 ± 1,54	9,25 ± 0,71	9,93 ± 0,37	7,99 ± 0,64
5%	5,92 ± 0,29	6,15 ± 0,72	8,35 ± 0,04	9,93 ± 0,9	10,13 ± 0,73	8,98 ± 0,40
Mật độ vi khuẩn <i>L. acidophilus</i> LB trên <i>N. oculata</i> + PBS (Log CFU/mL)						
3%	5,16 ± 0,64	6,56 ± 1,1	7,92 ± 0,46	8,05 ± 0,23	8,76 ± 0,1	7,39 ± 0,08
3.5%	5,22 ± 0,63	6,81 ± 0,90	7,03 ± 0,89	8,93 ± 1,11	8,68 ± 0,02	8,90 ± 1,53
4%	5,56 ± 0,39	6,45 ± 0,98	6,78 ± 1,53	8,56 ± 0,72	9,64 ± 0,03	9,02 ± 0,75
5%	5,75 ± 0,09	6,89 ± 0,55	7,77 ± 0,94	9,20 ± 0,84	9,37 ± 0,09	8,72 ± 0,14
Mật độ vi khuẩn <i>L. acidophilus</i> LB trên <i>S. platensis</i> + PBS (Log CFU/mL)						
3%	5,69 ± 0,49	7,02 ± 0,01	9,17 ± 0,45	10,42 ± 0,39	10,82 ± 0,38	9,01 ± 0,68
3.5%	5,38 ± 0,54	7,05 ± 0,09	9,67 ± 0,12	10,45 ± 0,11	10,49 ± 0,37	10,13 ± 0,49
4%	5,88 ± 0,62	8,73 ± 1,12	9,40 ± 0,69	9,66 ± 0,78	11,16 ± 0,28	10,21 ± 0,44
5%	5,59 ± 0,43	9,00 ± 0,45	9,58 ± 0,42	10,26 ± 0,49	11,00 ± 0,73	10,78 ± 0,46

Trong môi trường MRS, mật độ vi khuẩn tăng đều đặn và đạt cao nhất vào ngày thứ 4 (10,57 Log CFU/mL), sau đó giảm dần vào ngày thứ 5 (8,39 Log CFU/mL). Trong các môi trường chứa tảo, vi khuẩn LB có xu hướng phát triển mạnh mẽ hơn. Đặc biệt, môi trường chứa *S. platensis* cho thấy ảnh hưởng tích cực đến sự phát triển của *L. acidophilus* cao hơn so với các môi trường bổ sung tảo *I. galbana* và *N. oculata*. Khi *S. platensis* được bổ sung ở nồng độ 3% cho mật độ vi khuẩn LB đạt 10,82 Log CFU/mL tương đương với khi được nuôi trong môi trường MRS vào ngày thứ 4. Giá trị mật độ này lên đến 11 Log CFU/mL khi tăng nồng độ tảo lên 5%.

Rezvani và cộng sự lưu ý rằng các giai đoạn tăng trưởng của *Lactobacillus* có thể khác nhau tùy thuộc vào mỗi chủng [66]. Thông thường, các chủng *Lactobacillus* thường được nuôi cấy trong 2 ngày, tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi nồng độ vi khuẩn LB ban đầu đưa vào ở mức thấp (~5 Log CFU/mL) do vậy thời gian nuôi vi khuẩn cần kéo dài lên 4 ngày để đạt được mật độ 10,82 Log CFU/mL.

❖ ***Hoạt tính sinh axit lactic của chủng *L. acidophilus* LB trong môi trường MRS và các môi trường chứa tảo.***

Bên cạnh giá trị mật độ tế bào, sự thay đổi hàm lượng axit lactic sinh ra trong môi trường theo thời gian thí nghiệm cũng được kiểm tra. Kết quả thu được cho thấy khi nuôi cấy trong môi trường *I. galbana* + PBS, vi khuẩn *L. acidophilus* LB

không có khả năng sinh axit lactic. Trong khi, nồng độ axit lactic đo được ở môi trường *N. oculata* và *S. platensis* đạt cao nhất lần lượt là 2,91 và 6,85 mg/mL sau 4 ngày. Kết quả này thấp hơn so với khi nuôi trong môi trường MRS (17,5 mg/mL). Ngoài ra, không có thay đổi đáng kể nào về nồng độ axit lactic được quan sát thấy khi tăng nồng độ sinh khối tảo (Bảng 3.8). Đối với vi khuẩn lactic, cần có thành phần đường trong môi trường để vi khuẩn có thể chuyển hóa tạo thành axit lactic. Vì vậy khi lên men vi khuẩn *L. acidophilus* LB trong môi trường tảo không bổ sung bất kỳ nguồn đường nào có thể là nguyên nhân làm giảm hàm lượng axit lactic tạo thành so với môi trường MRS (chứa 20 g/L glucose).

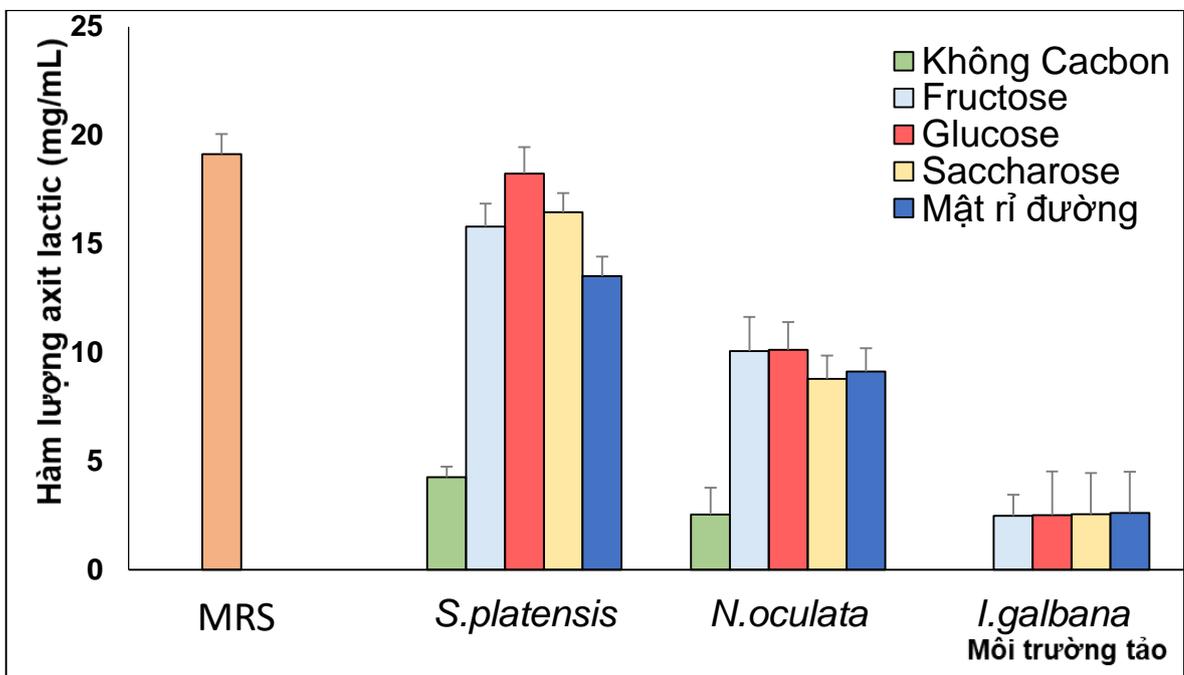
Bảng 3.8: Hàm lượng axit lactic tạo thành của *L. acidophilus* LB trong môi trường nuôi cấy bổ sung các loại và nồng độ sinh khối tảo khô khác nhau (mg/mL)

Nồng độ tảo (%)	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
Hàm lượng axit lactic trên môi trường MRS (mg/mL)					
0	12,60 ± 0,47	14,40 ± 0,94	14,81 ± 0,84	17,53 ± 0,13	12,60 ± 0,60
Hàm lượng axit lactic trên môi trường <i>I. galbana</i> + PBS (mg/mL)					
-					
Hàm lượng axit lactic trên môi trường <i>N. oculata</i> + PBS (mg/mL)					
3%	-	-	1,02 ± 0,24	2,54 ± 0,51	2,32 ± 0,02
3.5%	-	-	0,98 ± 0,83	2,91 ± 0,59	2,88 ± 0,33
4%	-	-	0,75 ± 0,26	2,91 ± 0	2,45 ± 0,2
5%	-	-	1,22 ± 0,61	2,91 ± 0	2,72 ± 0,84
Hàm lượng axit lactic trên môi trường <i>S. platensis</i> + PBS (mg/mL)					
3%	2,96 ± 1,05	3,32 ± 0,40	3,86 ± 0,63	4,26 ± 0,19	3,78 ± 1,46
3.5%	2,54 ± 0,96	2,87 ± 0,65	3,05 ± 0,85	3,48 ± 1,89	3,38 ± 1,16
4%	2,60 ± 0,34	3,03 ± 1,35	3,62 ± 0,64	4,20 ± 1,36	3,86 ± 0,95
5%	2,95 ± 0,89	3,79 ± 0,17	5,13 ± 1,36	6,85 ± 0,20	6,06 ± 1,23

❖ **Ảnh hưởng của việc bổ sung nguồn cacbon vào môi trường chứa sinh khối tảo**

Trong thí nghiệm tiếp theo, 4 loại đường gồm fructose, glucose, saccharose và mật rỉ đường (2 g/L) đã được thử nghiệm bổ sung vào môi trường chứa 3% các loại tảo thử nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của chúng đến hàm lượng axit lactic tạo

thành bởi chủng *L. acidophilus* LB. Kết quả tại Hình 3.11. cho thấy các nguồn đường thử nghiệm khi kết hợp cùng sinh khối tảo *S. platensis* 3% cho kết quả khả quan về hàm lượng axit lactic tạo thành. Cụ thể, khi bổ sung 2 g/L glucose, lượng axit lactic tạo thành ở môi trường tảo này đã tăng cao đáng kể, đạt đến 18,24 mg/mL. Giá trị này không khác biệt nhiều so với hàm lượng axit tạo thành trong môi trường MRS, đạt 19,13 mg/mL. Trong khi đó, việc bổ sung nguồn cacbon là mật rỉ đường và saccharose không làm tăng khả năng sinh tổng hợp axit lactic, hàm lượng axit lactic thu được đạt lần lượt là 13,52 mg/mL và 16,45 mg/mL. Bốn loại đường thử nghiệm khi kết hợp với các loại tảo khác như *I. galbana* hay *N. oculata* không phải là môi trường phù hợp để chủng *L. acidophilus* LB sinh ra axit lactic. Hàm lượng axit lactic tạo thành chỉ dao động từ 2,5 đến 10 mg/mL.



Hình 3. 11: Ảnh hưởng của nguồn đường bổ sung đến hàm lượng axit lactic tạo thành trong các môi trường chứa sinh khối tảo

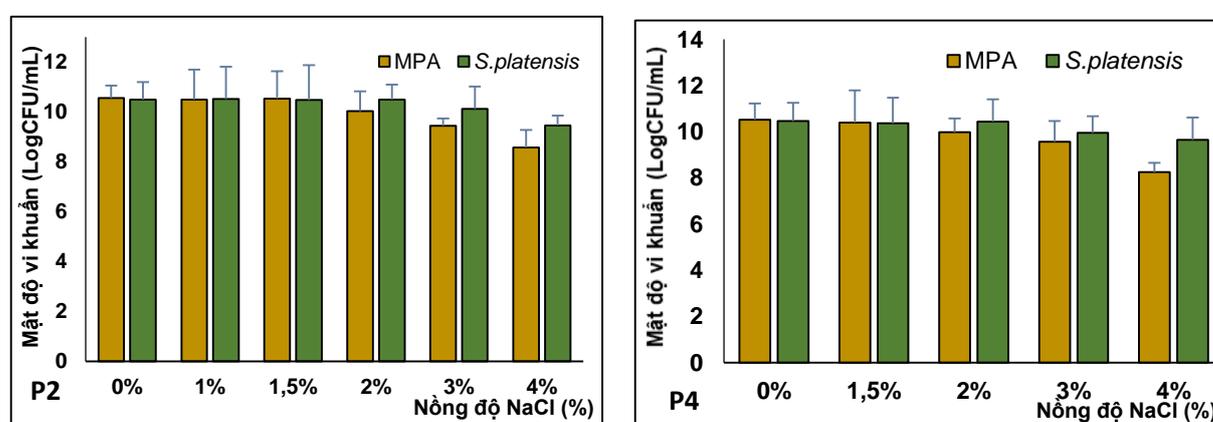
Tóm lại, qua quá trình khảo sát chúng tôi đã lựa chọn được 3 chủng vi khuẩn gồm *Bacillus subtilis* P2, *Bacillus* sp. P4 và *Lactobacillus acidophilus* LB có khả năng sử dụng sinh khối tảo *S. platensis* để hỗ trợ sinh trưởng đồng thời vẫn giữ được hoạt tính probiotic vốn có của chúng khi nuôi cấy trong môi trường truyền thống như MPA hay MRS. Qua các nghiên cứu này, đã chứng minh được khả năng sử dụng nguồn tảo như một môi trường nuôi vi khuẩn để thay thế cho các môi trường cơ bản điển hình trong phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, nhu cầu dinh dưỡng của mỗi loại vi khuẩn có thể dẫn đến sự khác biệt về nồng độ tảo cần bổ sung cho môi trường. Đối với 2 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* là *Bacillus subtilis* P2 và

Bacillus sp. P4, nồng độ sinh khối tảo *S. platensis* bổ sung trong môi trường là 1% trong khi đó, chủng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* cần sử dụng môi trường chứa 3% sinh khối tảo *S. platensis* + 2% glucose. Từ các kết quả thu được nêu trên, để tiếp tục tiến hành sử dụng đa chủng vi khuẩn có lợi cho định hướng nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học sẽ cần phải có các nghiên cứu chuyên sâu hơn về khả năng sống sót trong điều kiện cực trị để có thể sử dụng sản phẩm tạo thành trong các điều kiện thực tế. Vì vậy nghiên cứu về khả năng tồn tại của 3 chủng vi khuẩn lựa chọn trong các điều kiện nhiệt độ, pH và nồng độ muối khác nhau đã được tiến hành.

3.5. Đánh giá khả năng chịu đựng của vi khuẩn có lợi lựa chọn khi sinh trưởng trong môi trường chứa tảo ở một số điều kiện cực trị (độ mặn, nhiệt độ, pH)

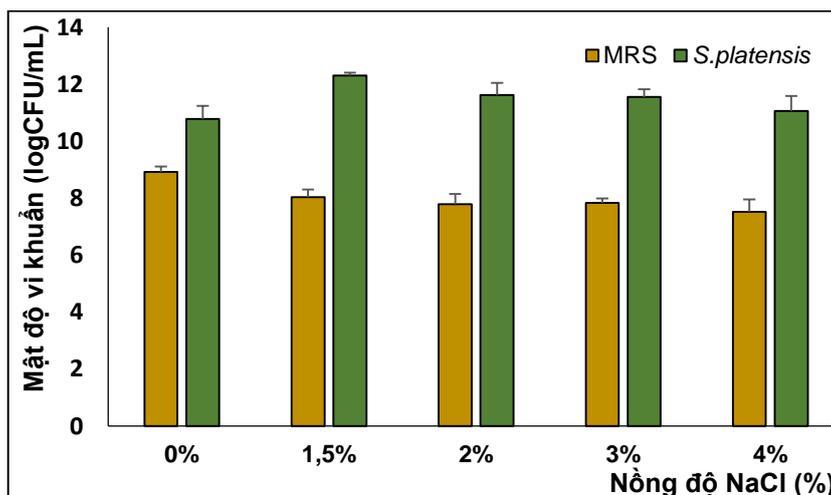
3.5.1. Ảnh hưởng của nồng độ muối

Các nồng độ muối khác nhau (0; 1,5; 2; 3 và 4%) đã được bổ sung vào môi trường tảo *S. platensis* 1% và môi trường MPA để đánh giá khả năng chịu mặn của 2 chủng P2 và P4. Kết quả cho thấy, từ nồng độ 0 – 1,5%, mật độ vi khuẩn ở cả 2 môi trường thí nghiệm xấp xỉ nhau, trong khoảng 10,2 đến 10,4 Log CFU/mL, nhưng khi nồng độ muối tăng lên 4% NaCl đã làm giảm khả năng sống sót của hai chủng P2 và P4 nuôi trong môi trường MPA. Mật độ vi khuẩn ở điều kiện này chỉ đạt 8,5 Log CFU/mL ở chủng P2 và 8,2 Log CFU/mL ở chủng P4, thấp hơn so với khi vi khuẩn được nuôi trong môi trường chứa tảo đạt ~10 Log CFU/mL. Theo nghiên cứu của M. Ghoul và cộng sự về tảo biển cho thấy các polysaccharides có trong tảo như alginate, carrageenan, agar... vừa có tác dụng làm nguồn dinh dưỡng cho *Escherichia coli* cũng như bảo vệ vi khuẩn trong một số điều kiện khắc nghiệt [67]. Do vậy, đây cũng có thể là nguyên nhân khiến cho các chủng vi khuẩn P2 và P4 có khả năng sinh trưởng tốt hơn trong điều kiện độ mặn cao khi nuôi trong môi trường chứa tảo.



Hình 3.12: Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến các chủng thuộc chi *Bacillus*

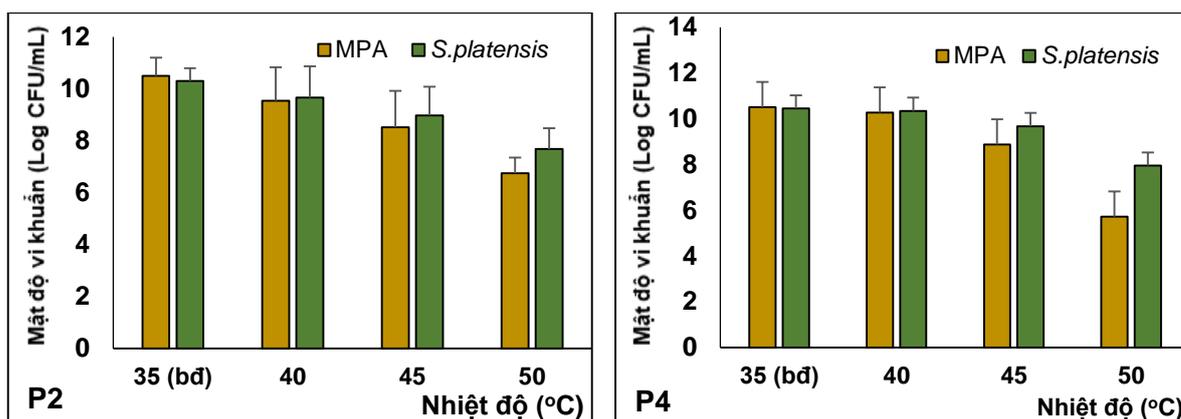
Ảnh hưởng của các nồng độ NaCl khác nhau (0; 1,5; 2; 3 và 4%) đến sinh trưởng của chủng *L. acidophilus* LB trong môi trường tảo cũng được so sánh với khi nuôi trong môi trường MRS được bổ sung các nồng độ muối như trên. Kết quả trình bày trong Hình 3.13 chỉ ra, trong môi trường nuôi cấy có bổ sung *S. platensis* 3% và NaCl 1,5%, mật độ vi khuẩn đạt cao nhất 12,31 Log CFU/mL, cao hơn khoảng 1,5 lần so với môi trường MRS chứa NaCl 1,5%. *S. platensis* còn có khả năng bảo vệ *L. acidophilus* LB ngay cả khi ở nồng độ muối tăng lên 4%, tại điều kiện này chủng LB vẫn đạt mật độ tương đương với môi trường không bổ sung muối.



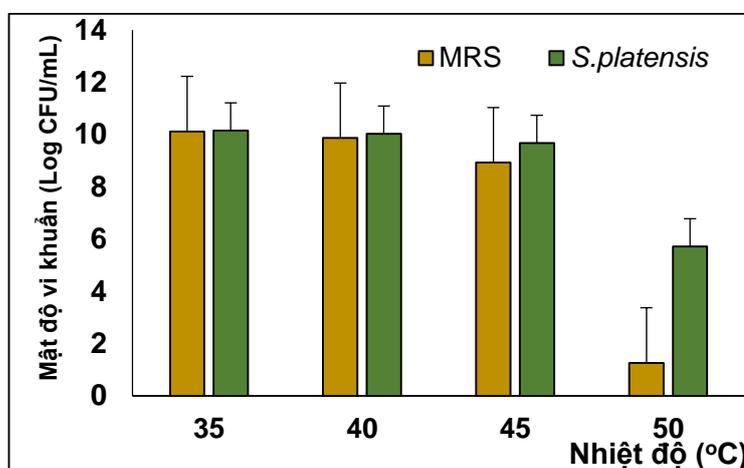
Hình 3.13: Ảnh hưởng của các nồng độ NaCl đến sinh trưởng của chủng *L. acidophilus* LB

3.5.2. Ảnh hưởng của sốc nhiệt

Mật độ vi khuẩn của 2 chủng thuộc chi *Bacillus* ở nhiệt độ ban đầu (35 °C) và khi tiến hành sốc nhiệt ở 40 °C ở môi trường tảo và môi trường MPA có khả năng sinh trưởng gần như tương đương, mật độ vi khuẩn nằm trong khoảng 10 Log CFU/mL. Khi nghiên cứu đến ảnh hưởng của nhiệt độ thì nhìn chung, các thang nhiệt độ cao có thể gây ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn nhưng không gây chết hoàn toàn do *Bacillus* là một loài vi khuẩn Gram dương có khả năng sống sót trong môi trường bất lợi thông qua quá trình hình thành bào tử [68]. Nhưng khi nhiệt độ tăng lên đến 45 °C, mật độ vi khuẩn có giảm nhẹ, tuy nhiên môi trường tảo vẫn có số lượng vi khuẩn sống sót cao hơn so với môi trường MPA (được coi là môi trường ĐC). Đến 50 °C, vi khuẩn nuôi trong môi trường ĐC đã bị ức chế sinh trưởng, mật độ vi khuẩn giảm xuống chỉ còn 6,75 Log CFU/mL, nhưng ở môi trường tảo chủng P2 vẫn duy trì mật độ là 7,69 Log CFU/mL. Tương tự, chủng P4 khi sốc nhiệt ở 50 °C, mật độ vi khuẩn cũng đạt 7,93 Log CFU/mL khi nuôi trong môi trường tảo, còn môi trường MPA mật độ đã giảm xuống còn 5,72 Log CFU/mL (Hình 3.14).



Hình 3.14: Ảnh hưởng của sốc nhiệt đến sinh trưởng của các chủng thuộc chi *Bacillus*



Hình 3.15: Ảnh hưởng của sốc nhiệt đến sinh trưởng của vi khuẩn *L.acidophilus* LB

Kết quả từ Hình 3.15 cho thấy *L. acidophilus* LB có khả năng sống sót tốt sau khi chịu sốc nhiệt ở 40 °C, tỷ lệ sống của vi khuẩn vẫn đạt trên 99% trong cả môi trường MRS và môi trường có bổ sung 3% *S. platensis*. Nhưng khi sốc nhiệt ở 45 °C đã có sự thay đổi, mật độ vi khuẩn sống sót của *L. acidophilus* LB trong môi trường MRS giảm xuống còn 8,93 Log CFU/mL, trong khi ở môi trường có bổ sung *S. platensis*, số lượng tế bào vẫn ổn định ở mức 9,68 Log CFU/mL. Đến khi tiến hành sốc nhiệt ở nhiệt độ 50 °C, mật độ vi khuẩn trong môi trường MRS giảm mạnh còn 1,26 Log CFU/mL, còn trong môi trường chứa *S. platensis*, mặc dù tỷ lệ sống sót của LB giảm xuống nhưng số lượng tế bào sống vẫn đạt 5,72 Log CFU/mL.

Như vậy, các chủng vi khuẩn *B. subtilis* P2, *Bacillus* sp. P4 và *L. acidophilus* LB có khả năng chịu sốc nhiệt tốt ở các nhiệt độ thử nghiệm khi được nuôi trong môi trường chứa sinh khối tảo *S. platensis*. Khi sốc nhiệt ở 50 °C, có thể chủng *L. acidophilus* LB không có khả năng sinh bào tử nên mật độ vi khuẩn của giảm mạnh hơn so với 2 chủng *Bacillus* - là các chủng có khả năng sinh bào tử.

3.5.3. Ảnh hưởng của pH

Các chủng vi khuẩn nghiên cứu chỉ thể hiện được hoạt tính probiotic của chúng nếu có thể chịu được pH axit trong đường tiêu hóa vật nuôi. Trước khi đến đường ruột, vi khuẩn phải tồn tại trong môi trường axit của dạ dày khoảng 3 giờ, thông thường pH trong dạ dày khác nhau ở mỗi loại vật nuôi và dao động trong khoảng từ 2,0 - 4,0 [69]. Để đánh giá ảnh hưởng của pH lên khả năng tồn tại của 3 chủng vi khuẩn lựa chọn, dịch nuôi 3 chủng vi khuẩn *B. subtilis* P2, *Bacillus* sp. P4 và *L. acidophilus* LB trong môi trường tảo và môi trường MPA hay MRS được ly tâm thu sinh khối, sau đó bổ sung vào môi trường có các giá trị pH khác nhau (1, 2 hoặc 3) và được theo dõi sự thay đổi mật độ vi khuẩn trong 3 giờ. Kết quả được chỉ ra ở Bảng 3.9; 3.10 và 3.11 cho thấy lợi ích của việc sử dụng môi trường tảo được biểu hiện rõ rệt, vi khuẩn khi được nuôi trong môi trường chứa sinh khối tảo được bảo vệ ở các môi trường pH axit rất thấp. Sau 3 giờ thử nghiệm, mật độ vi khuẩn chủng P2 ở pH=2 và pH=1 vẫn đạt lần lượt là 6,58 và 4,92 Log CFU/mL, trong khi ở môi trường MPA của các pH tương ứng vi khuẩn gần như bị ức chế hoàn toàn.

Kết quả tương tự cũng thu được ở chủng *Bacillus* sp. P4, khi pH môi trường giảm xuống pH1 - pH2 và thời gian tiếp xúc kéo dài đã làm giảm khả năng sống sót của vi khuẩn, tại các điều kiện pH này vi khuẩn nuôi trong môi trường MPA không có khả năng sống sót, trong khi đó vi khuẩn khi được nuôi trong môi trường tảo mật độ vi khuẩn đạt lần lượt là 4,96 và 6,58 Log CFU/mL.

Bảng 3.9: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của *B. subtilis* P2

	<i>B. subtilis</i> P2 trong môi trường MPA				<i>B. subtilis</i> P2 trong môi trường chứa <i>S. platensis</i> (1%)			
	pH 7	pH 3	pH 2	pH 1	pH 7	pH 3	pH 2	pH 1
0 h	9,78 ± 0,35				9,13 ± 0,27			
1 h	10,02 ± 1,56	8,01 ± 0,1	4,19 ± 1,32	1,34 ± 0,2	9,86 ± 0,64	8,87 ± 1,22	8,05 ± 0,11	7,01 ± 1,09
2 h	10,49 ± 1,11	7,56 ± 0,21	3,84 ± 1,17	-	9,55 ± 1,43	8,62 ± 0,43	7,76 ± 0,43	5,68 ± 1,28
3 h	10,77 ± 1,09	6,85 ± 0,46	2,52 ± 0,65	-	10,81 ± 1,78	7,95 ± 0,28	6,58 ± 0,25	4,92 ± 0,67

Bảng 3. 10: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của *Bacillus* sp. P4

	<i>Bacillus</i> sp. P4 trong môi trường MPA				<i>Bacillus</i> sp. P4 trong môi trường chứa <i>S. platensis</i> (1%)			
	pH 7	pH 3	pH 2	pH 1	pH 7	pH 3	pH 2	pH 1
0 h	10,04 ± 0,52				9,88 ± 0,32			
1 h	10,25 ± 1,72	9,61 ± 0,15	4,59 ± 0,37	1,15 ± 0,5	9,97 ± 0,43	9,17 ± 0,31	7,07 ± 0,63	6,56 ± 0,11
2 h	10,43 ± 1,03	8,82 ± 0,45	3,36 ± 0,29	-	10,19 ± 1,02	8,92 ± 1,45	6,90 ± 0,51	5,52 ± 0,21
3 h	10,67 ± 1,85	7,71 ± 0,52	2,22 ± 0,16	-	10,54 ± 0,78	8,93 ± 0,26	6,58 ± 0,29	4,96 ± 0,09

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tồn tại của *L. acidophilus* LB

	<i>L. acidophilus</i> LB trong môi trường MRS				<i>L. acidophilus</i> LB trong môi trường chứa <i>S. platensis</i> (3%)			
	pH 7	pH 3	pH 2	pH 1	pH 7	pH 3	pH 2	pH 1
0 h	8,20 ± 0,5				8,00 ± 0,32			
1 h	8,20 ± 1,49	8,10 ± 0,11	2,38 ± 0,58	1,34 ± 1,28	8,37 ± 0,45	7,80 ± 1,38	3,50 ± 0,72	3,26 ± 0,35
2 h	8,29 ± 2,16	2,30 ± 3,99	1,60 ± 1,40	-	8,35 ± 1,02	8,49 ± 1,51	4,41 ± 0,28	2,72 ± 1,05
3 h	8,42 ± 2,30	2,23 ± 1,07	0,83 ± 1,43	-	8,24 ± 1,58	7,13 ± 1,84	3,85 ± 0,65	2,45 ± 0,32

Đối với chủng *L. acidophilus* LB, kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến khả năng sống của chúng được trình bày trong Bảng 3.11. Ở mức pH thấp nhất là pH 1, LB không thể sống sót trong môi trường MRS sau 2 giờ xử lý. Ngược lại, khi vi khuẩn được nuôi trong môi trường tảo *S. platensis*, mật độ vi khuẩn vẫn duy trì ở mức 2,45 Log CFU/mL ngay cả sau 3 giờ xử lý. Ở pH 2, khả năng sống cao hơn cũng được quan sát thấy trong môi trường tảo, đạt 3,85 Log CFU/mL sau 3 giờ. Mặc dù số lượng vi khuẩn trong hai môi trường ở pH 3 là tương tự nhau sau 1 giờ xử lý, nhưng mật độ vi khuẩn trong môi trường MRS đã giảm đáng kể khi thời gian thử nghiệm tăng lên 2 và 3 giờ. Trong khi đó, khả năng sống sót của *L. acidophilus* LB trong môi trường *S. platensis* vẫn ổn định ở 7,13 Log CFU/mL ngay cả sau 3 giờ xử lý.

Các kết quả này cho thấy, việc sử dụng *S. platensis* làm nguồn dinh dưỡng chính trong môi trường nuôi cấy của các chủng vi khuẩn nghiên cứu *B. subtilis* P2, *Bacillus* sp. P4 và *L. acidophilus* LB có tác dụng bảo vệ chúng trong các điều kiện khắc nghiệt như nồng độ muối cao 4%, pH thấp từ 1 -2 trong 3 giờ hay sốc nhiệt ở 50 °C. Trong khi ở những điều kiện này khả năng sống sót của vi khuẩn đã bị ảnh hưởng nhiều nếu nuôi trong môi trường MPA hay MRS. Kết quả tương tự cũng được thấy ở nghiên cứu của Sylwia và cộng sự khi sử dụng tảo *Chlorella vulgaris* giúp tăng khả năng sống sót của các chủng *Lactobacillus* spp. ở pH 2,5 [61].

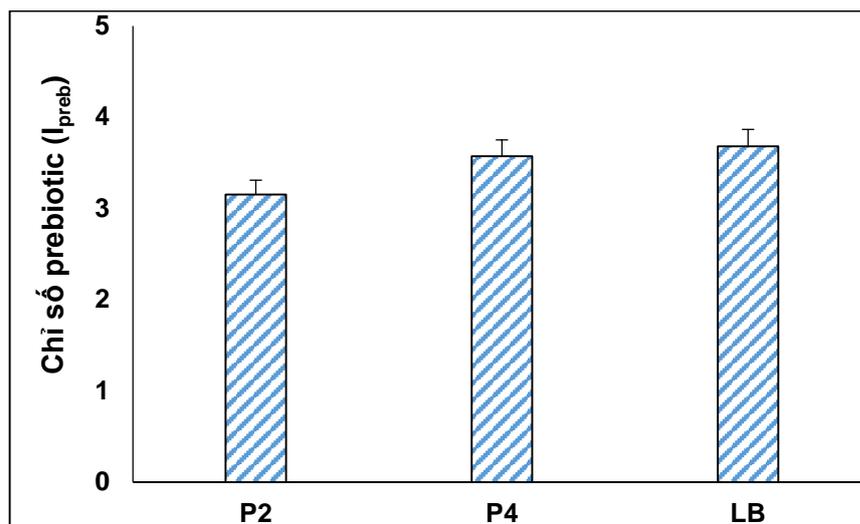
3.6. Đánh giá khả năng sử dụng prebiotic từ tảo *S. platensis*

Prebiotic là chất xơ sinh học được lên men bởi hệ vi sinh vật đường ruột của vật chủ, giúp kích thích sự phát triển, cải thiện hoạt động và sự khỏe mạnh của vật chủ. Sinh khối tảo cũng được chứng minh có chứa thành phần prebiotic, vì vậy nó có thể đóng vai trò kích thích sinh trưởng của vi khuẩn khi bổ sung vào môi trường [47].

3.6.1. Xác định chỉ số prebiotic

Trong nghiên cứu này, chỉ số prebiotic của tảo *S. platensis* được xác định bằng cách nuôi 3 chủng vi khuẩn lựa chọn gồm P2, P4 và LB, thu sinh khối rửa và hòa tan lại bằng nước cất khử trùng trước khi được chuyển riêng rẽ vào môi trường MT1 (môi trường cơ bản + Glucose 1%) và MT2 (môi trường cơ bản + *S. platensis* 1%) với tỷ lệ 10% và nuôi lắc ở 35°C. Khả năng sinh trưởng của các vi khuẩn lựa chọn sau 24 giờ nuôi được xác định thông qua mật độ tế bào và được sử dụng để tính toán chỉ số prebiotic.

Theo Palframan và cộng sự, chỉ số prebiotic lớn hơn 1 tức là nguồn prebiotic sử dụng có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của probiotic. Trái lại, chỉ số prebiotic có giá trị nhỏ hơn 1 thể hiện nguồn prebiotic nghiên cứu không có tác động rõ rệt đến sinh trưởng của probiotic [46]. Kết quả thể hiện ở Hình 3.16. cho biết, tảo *S. platensis* đạt giá trị I_{preb} là 3,15 đối với chủng P2; 3,57 đối với chủng P4 và 3,68 đối với chủng LB. Kết quả nghiên cứu của Đặng Thu Hương và cộng sự khi đánh giá hoạt tính prebiotic chiết xuất từ các loại hạt trái cây cũng cho thấy chất xơ trong hạt nhãn có chỉ số prebiotic đạt 3,38 đối với chủng *Lactobacillus casei* PK2 [70]. Như vậy, dựa trên kết quả thí nghiệm có thể kết luận rằng chất xơ có trong tảo *S. platensis* có tác dụng kích thích đến sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn P2, P4 và LB nghiên cứu. Hay nói cách khác, các chủng vi khuẩn nghiên cứu có thể đã sử dụng prebiotic có trong tảo cho sự sinh trưởng của chúng.

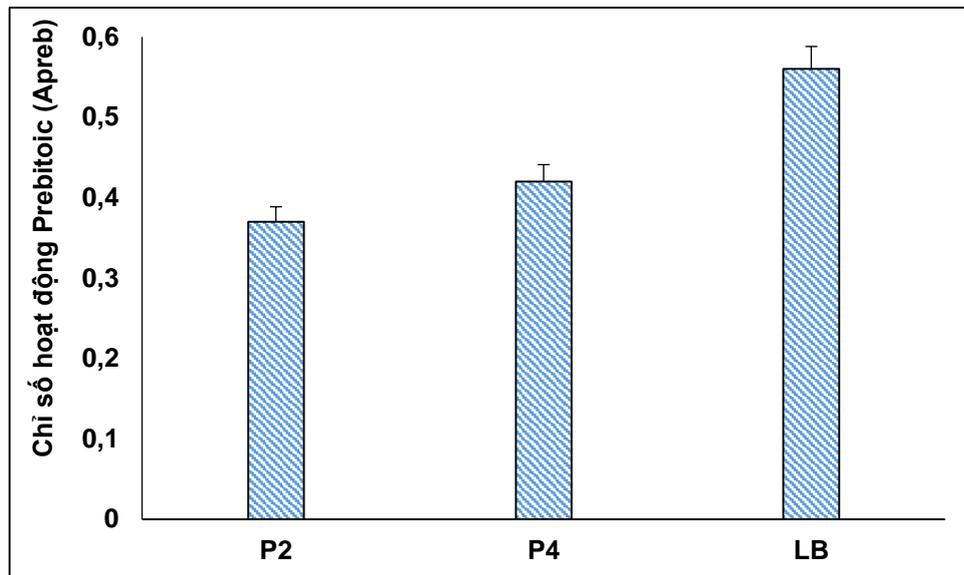


Hình 3.16: Chỉ số prebiotic của vi khuẩn nghiên cứu sinh trưởng trong môi trường tảo *S. platensis*

3.6.2. Xác định chỉ số hoạt động prebiotic

Bên cạnh chỉ số prebiotic, điểm hoạt động prebiotic (A_{preb}) của các vi khuẩn nghiên cứu cũng được tính toán để khẳng định thêm khả năng sử dụng prebiotic trong tảo *S. platensis*. Chỉ số hoạt động prebiotic (A_{preb}) của tảo *S. platensis* được xác định và thể hiện thông qua kết quả ở Hình 3.17. Các giá trị A_{preb} đạt được là 0,37; 0,42 và 0,56 tương ứng với chủng P2; P4 và LB.

Huebner và cộng sự nhận định rằng, nếu chỉ số A_{preb} của một prebiotic có giá trị âm thì sự sinh trưởng của probiotic thử nghiệm trên môi trường chứa prebiotic là thấp hơn so với đối chứng (glucose) và đồng thời với đó, sự phát triển của probiotic kém hơn so với vi khuẩn gây bệnh thử nghiệm (ví dụ như *V. parahaemolyticus*) [62]. Vì vậy, trong nghiên cứu hiện tại, kết quả A_{preb} thu nhận được đều có giá trị dương, điều này đã chứng minh rằng prebiotic từ tảo *S. platensis* có tác dụng tích cực đến sinh trưởng của 3 chủng probiotic nghiên cứu.



Hình 3.17: Chỉ số hoạt động prebiotic của vi khuẩn nghiên cứu sinh trưởng trong môi trường chứa tảo *S. platensis*

3.7. Hàm lượng axit béo của sinh khối tảo sau khi lên men với *L. acidophilus* LB

Trong nghiên cứu này việc sử dụng sinh khối tảo thay cho các thành phần môi trường truyền thống để nhân nuôi vi khuẩn probiotic không chỉ nhằm mục đích tạo ra được sản phẩm có mật độ các chủng vi khuẩn có lợi cùng các hoạt chất sinh học của chúng mà còn chứa các hợp chất axit béo không no đa nối đôi có trong sinh khối tảo, các axit béo này rất hiếm và khó tổng hợp trong phòng thí nghiệm. Tác giả Hoseinifar và cộng sự cho thấy có một tỉ lệ phù hợp của PUFA trong khẩu phần ăn, đặc biệt là các omega-3 và omega-6 có thể tăng cường khả năng miễn dịch không đặc hiệu, giúp cải thiện hiệu suất tăng trưởng khi so sánh với các chế độ thức ăn

khác của tôm thẻ chân trắng [71]. Tuy nhiên hàm lượng axit béo chứa trong sinh khối tảo này có bị ảnh hưởng trong quá trình lên men với vi khuẩn hay không là một vấn đề cần tìm hiểu. Do vậy, trong nghiên cứu này bước đầu tiến hành khảo sát thành phần axit béo trong hỗn hợp lên men giữa vi khuẩn *L. acidophilus* LB và sinh khối tảo để so sánh với hàm lượng axit béo có sẵn trong môi trường tảo ban đầu.

Phân tích sắc ký khí (GC) đã được thực hiện để so sánh hàm lượng axit béo của ba mẫu, bao gồm sinh khối *L. acidophilus* LB nuôi cấy trong môi trường MRS, sinh khối *S. platensis* và hỗn hợp lên men của *L. acidophilus* LB với sinh khối *S. platensis*. Kết quả trình bày trong Bảng 3.12. cho thấy sự khác biệt đáng kể về thành phần axit béo giữa hỗn hợp lên men của *L. acidophilus* LB trong môi trường MRS và trong môi trường chứa tảo. Mẫu nuôi cấy trong môi trường MRS chủ yếu chứa các axit béo bão hòa, như axit decanoic (C10:0), hexadecanoic (C16:0) và eicosanoic (C20:0), chiếm 97,48% tổng hàm lượng axit béo. Tuy nhiên, khi lên men trong môi trường chứa tảo, hàm lượng axit decanoic giảm đáng kể từ 83,93% xuống còn 40,71%. Trong khi đó, axit hexadecenoic (C16:1n-7) không có mặt trong mẫu MRS hay sinh khối tảo, nhưng lại được phát hiện với lượng đáng kể, chiếm 12,53% TFA trong hỗn hợp lên men vi khuẩn và tảo. Điều này cho thấy vi khuẩn này có thể kích hoạt quá trình chuyển hóa hợp chất no C16:0 thành dạng không no (không bão hòa) trong quá trình lên men với sinh khối tảo.

Ngoài ra, việc nuôi cấy *L. acidophilus* LB trong môi trường chứa *S. platensis* cũng làm tăng đáng kể lượng axit linoleic (C18:2n-6, omega-6) trong sinh khối tảo lên 1,62 lần, từ 22,76 % đến 36,29 % TFA. Hơn nữa, các axit béo khác bao gồm axit pentadecanoic (C15:2n-6), axit heptadecadiene (C17:2n-6), axit octadecenoic (C18:1n-9) và axit eicosanoic (C20:0) có thể đã trải qua quá trình chuyển đổi sang các dạng khác, dẫn đến sự giảm hoặc không còn trong mẫu lên men vi khuẩn/tảo. Những thay đổi này đã làm tăng đáng kể hàm lượng axit béo không no đa nối đôi (PUFAs) lên 48,82 % TFA, cao hơn lần lượt 1,39 và 22,5 lần so với mẫu nuôi cấy trong môi trường MRS và sinh khối tảo ban đầu.

Bảng 3. 12: Thành phần axit béo (% trên TFA) trong hỗn hợp lên men của *L. acidophilus* LB và *S. platensis*

Loại axit béo	Tên thường gọi	<i>L. acidophilus</i> sinh trưởng trong MRS	Sinh khối <i>S. platensis</i>	Hỗn hợp lên men của <i>L. acidophilus</i> LB trong môi trường tảo <i>S. platensis</i>
PUFAs (% TFA)		2,16 ± 0,52	35,14 ± 1,31	48,82 ± 0,72
C15:2n-6 Pentadecanoic acid		-	10,86 ± 0,19	-
C16:1n-7 Hexadecenoic acid	Omega-7	-	-	12,53 ± 0,69
C17:2n-6 Heptadecadiene acid		-	1,52 ± 0,46	-

C18:1n-9 Octadecenoic acid	Omega-9	2,16 ± 0,52	-	-
C18:2n-6 All cis-9, 12-octadecadienoic acid	Omega-6	-	22,76 ± 0,67	36,29 ± 0,03
SFAs (% TFA)		97,48 ± 0,34	64,84 ± 1,86	51,16 ± 3,47
C10:0 Decanoic acid	Capric acid	83,93 ± 0,22	58,33 ± 0,48	40,71 ± 0,21
C15:0 Pentadecanoic acid	Pentadecylic acid	-	-	6,46 ± 1,35
C16:0 Hexadecanoic acid		9,63 ± 0,25	-	-
C18: 0 Octadecanoic acid	Steatic acid	-	2,78 ± 0,78	2,06 ± 0,69
C20:0 Eicosanoic acid		3,92 ± 0,15	-	-
C24:0 Tetracosanoic acid	Lignoceric acid	-	3,73 ± 0,60	1,93 ± 1,50

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

❖ KẾT LUẬN

1. Sàng lọc được 03 chủng vi khuẩn từ bộ chủng giống của phòng CNSH Tái tạo môi trường: *B. subtilis* P2 và *Bacillus* sp. P4 có hoạt tính enzyme tiêu hóa và ức chế *V. parahaemolyticus*; *L. acidophilus* LB sinh axit lactic.
2. Đã chọn được tảo *S. platensis* làm môi trường thích hợp thay thế cho MPA/MRS, giúp *B. subtilis* P2 và *Bacillus* sp. P4 đạt mật độ > 9,2 Log CFU/mL, đường kính phân giải amylase (8–10 mm), protease, cellulase (18–21 mm) và ức chế *V. parahaemolyticus* (~ 9mm); *L. acidophilus* LB đạt 10,57 Log CFU/mL và tạo 18,24 mg/mL axit lactic khi bổ sung 2 g/L glucose.
3. Ba chủng vi khuẩn lựa chọn khi nuôi trong *S. platensis* giúp tăng khả năng sống sót trong điều kiện cực trị: nhiệt độ 50°C, pH (1 - 3), NaCl 4% so với khi nuôi trong môi trường truyền thống MPA/MRS.
4. *S. platensis* còn là nguồn prebiotic cho sinh trưởng của vi khuẩn được thể hiện thông qua chỉ số prebiotic (Ipreb) của *B. subtilis* P2, *Bacillus* sp. P4, và *L. acidophilus* LB lần lượt đạt 3,15; 3,57; 3,68 và chỉ số hoạt động prebiotic (Apreb) đạt 0,37; 0,42; 0,56 tương ứng.
5. Lên men *L. acidophilus* LB trong 3% *S. platensis* tăng hàm lượng axit béo không no đa nối đôi (PUFAs) lên 48,82% TFA, cao hơn so với khi nuôi trong môi trường MRS và với sinh khối tảo ban đầu, đồng thời vẫn giữ được hợp chất ω 6, ω 7.

❖ KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu tối ưu các môi trường cũng như điều kiện phù hợp cho sự kết hợp đa chủng giữa *Bacillus* và *Lactobacillus* cho định hướng tạo chế phẩm sinh học bổ sung vào thức ăn cho vật nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kumar R., Ng T.H., Wang H.C., 2020, Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp, *Reviews in Aquaculture*, 12, pp. 1867–1880.
2. Amatul S. Md.A., Wan O. W.H.H., Mohd I. N.F., Amal M.N.A., Ina S. Md. Y., Zamri M. S., 2020, Vaccination trials against vibriosis in shrimp: A review. *Aquaculture Reports*, 18, 100471.
3. Okeke E.S., Chukwudozie K.I., Nyaruaba R., Ita R.E., Oladipo A., Ejeromedoghene O., Atakpa E.O., Agu C.V., Okoye C.O., 2022, Antibiotic resistance in aquaculture and aquatic organisms: a review of current nanotechnology applications for sustainable management. *Environ Sci Pollut Res Int*, 29(46), 69241–69274.
4. Ahmad A., W. Hassan S., Banat F., 2022, An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: food security and circular economy, *Bioengineered*, 13, pp. 9521–9547.
5. Jannathulla R., Rajaram V., Kalanjiam R., Ambasankar K., Muralidhar M., Dayal JS., 2019, Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources, *Aquaculture Research*, 50, pp. 3493–3506.
6. WHO, 1995, Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*.
7. Dương Thị Hoàng Oanh, Huỳnh Trường Giang, Nguyễn Thị Kim Liên, 2018, Mối liên hệ giữa sức khỏe tôm và biến động quần thể phytoplankton trong các ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*litopenaeus vannamei*) thâm canh, *Tạp Chí Khoa Học Đại Học Cần Thơ*, 13, tr. 159–168.
8. Dempsey E., Corr S.C., 2022, *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Front Immunol*, 13, 840245.
9. Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S., Menasaveta P., 2000, Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11), *Aquaculture*, 191, pp. 271–288.
10. Lee N.K., Kim W.S., Paik H.D., 2019, *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci Biotechnol*, 28(5), 1297–1305.
11. Hossain M.N., Afrin S., Humayun S., Ahmed M.M., Saha B.K., 2020, Identification and Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soya Paste. *Front Nutr*, 7, 27.

12. Sha H., Li L., Lu J., Xiong J., 2022, High nutrient induces virulence in the AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*, interpretation from the ecological assembly of shrimp gut microbiota, *Fish & Shellfish Immunology*, 127, pp. 758–765.
13. Olmos J., Acosta M., Mendoza G., Pitones V., 2020, *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution, *Archives of Microbiology*, 202, pp. 427–435.
14. Hamza AA., Abaci Gunyar O., 2022, Nutritional value of commercial broiler feed supplemented with olive mill waste fermented with probiotic *Rhizopus oryzae* strains, *Journal of Applied Microbiology*, 133, pp. 1872–1881.
15. Ashida H., Ogawa M., Kim M., Mimuro H., Sasakawa C., 2012, . Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier, *Nature Chemical Biology*, 8, pp. 36–45.
16. Dawood DH., Darwish MS., El-Awady AA., Mohamed AH., Zaki AA., Taher MA., 2021, Chemical characterization of Cassia fistula polysaccharide (CFP) and its potential application as a prebiotic in synbiotic preparation, *RSC Advances*, 11, pp. 13329–13340.
17. Toledo A., Frizzo L., Signorini M., Bossier P., Arenal A., 2019, Impact of probiotics on growth performance and shrimp survival: A meta-analysis, *Aquaculture*, 500, pp. 196–205.
18. Dawood MAO., Magouz FI., Salem MFI., Abdel-Daim HA., 2019, Modulation of digestive enzyme activity, blood health, oxidative responses and growth-related gene expression in GIFT by heat-killed *Lactobacillus plantarum* (L-137), *Aquaculture*, 505, pp. 127–136.
19. Kewcharoen W., Srisapoome P., 2019, Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains), *Fish & Shellfish Immunology*, 94, pp. 175–189.
20. Ray AK., Ghosh K., Ringø E., 2012, Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review, *Aquaculture Nutrition*, 18, pp. 465–492.
21. Nikoskelainen S., Ouweh AC., Bylund G., Salminen S., Lilius E-M., 2003, Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*), *Fish & Shellfish Immunology*, 15, pp. 443–452.

22. Hoseinifar S.H., Sun Y.Z., Wang A., Zhou Z., 2018, Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Microbiol*, 9, pp.24 - 29.
23. Nguyen T.T.P., Dang T.H.O., 2016, Sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic từ ruột một số loài cá da trơn có tiềm năng sử dụng làm probiotic, *Can Tho University, Journal of Science*, 44, tr.76 - 85.
24. Nguyen.T.T.L., Tran Q. P., Dang T.H. O., Nguyen T. N., 2017, Ảnh hưởng của vi khuẩn lactic bổ sung vào thức ăn lên khả năng kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), *Can Tho University, Journal of Science*, 52, tr. 122-130.
25. Hoang P.H., Cung T.N.M., Nguyen T.M., Đo T.L., Lê T.N.C., 2018, Isolation and selection of probiotic bacteria capable of forming biofilm for fermenting soybean meal, *Journal of Vietnamese Environment*, 9, pp. 99–105.
26. Nguyen H.P., Van Do T., Tran H.D., Nguyen T.T., 2021, Replacement of fish meal with defatted fermented soybean meals in pompano *Trachinotus blochii* (Lacepède, 1801) diets, *Annals of Animal Science*, 21, pp. 575–587.
27. De Morais MG., Vaz BDS., De Morais EG., Costa JAV., 2015, Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae, *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–15.
28. Sathasivam R., Ki J.S., 2018, A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Marine Drugs*, pp. 16 - 26.
29. Ahmad A., W. Hassan S., Banat F., 2022, An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: food security and circular economy. *Bioengineered*, 13(4), pp. 9521–9547.
30. Zhang P., Peng R., Jiang X., Jiang M., Zeng G., 2022, Effects of *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira pseudonana* monocultures on growth performance and nutrient composition of *Litopenaeus vannamei*, *Algal Research*, 66, pp. 102769.
31. Joel R., Vera Cruz E., Reyes A., 2020, Growth, length-weight relationship and condition factor of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with probiotic bacterium (*Bacillus amyloliquifaciens*) supplemented diet, 5, pp. 34-38.
32. Le. T.T., Nguyen.T.K.D., Nguyen N.V., 2022, Nghiên cứu và ứng dụng vi tảo trong nuôi trồng thủy sản, *Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn*, tr. 68–70.
33. Ashok Kumar N., Sridhar S., Jayappriyan KR., Raja R., 2023, Chapter 33 - Applications of microalgae in aquaculture feed, in *Handbook of Food and Feed*

- from Microalgae, Jacob-Lopes E, Queiroz MI, Maroneze MM, Zepka LQ, Editors. Academic Press. p. 421–433.
34. Devos M., Poisson L., Ergen F., Pencreac'h G., 2006, Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), pp. 548–554.
 35. Oostlander PC., Van Houcke J., Wijffels RH., and Barbosa MJ., 2020, Microalgae production cost in aquaculture hatcheries, *Aquaculture*, 525, pp. 735310.
 36. Molina Grima E., Sánchez Pérez JA., García Camacho F., Acién Fernández FG., López Alonso D., Segura Del Castillo CI., 1994, Preservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile, *Aquaculture*, 123, pp. 377–385.
 37. Ashok Kumar N., Sridhar S., Jayappriyan KR., Raja R., 2023, Applications of microalgae in aquaculture feed, in Handbook of Food and Feed from Microalgae, Elsevier. pp. 421–433.
 38. Zanella L., Vianello F., 2020, Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition, *Journal of Functional Foods*, 68, pp. 103919.
 39. Fayyad RJ., Dwaish AS., Ali Sulman IM., Lefta SN., 2022, Phytochemical profiling of hot and cold alcoholic extract from *Spirulina platensis* alga and Comparison between two extracts against multidrug -resistant bacteria, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, pp. 399–404.
 40. Habib M.A.B., Parvin M., Huntington T.C., 2008, A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish, *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*.
 41. Ngọc Anh, 2022, Trồng rong biển: Kỳ vọng bút phá, *Thủy Sản Việt Nam*. <<https://thuysanvietnam.com.vn/trong-rong-bien-ky-vong-but-pha/>>, accessed: 09/04/2024.
 42. Pham D.T., Dang D.H., Pham Q.K., Nguyen T.T., 2015, Đánh giá tác động sinh học của nguyên liệu sinh khối vi khuẩn tảo biển *Nannochloropsis oculata* làm thực phẩm chức năng, *Tạp chí Công Nghệ Sinh Học*, 2, pp. 259–267.
 43. Nguyen N. A., 2023, Nuôi sinh khối tảo biển - Giải pháp phát triển nghề nuôi ngao bền vững, Báo Nam Định điện tử. <<https://baonamdinh.vn/khoa-hoc-cong-nghe/202302/nuoi-sinh-khoi-tao-bien-giai-phap-phat-trien-nghe-nuoi-ngao-ben-vung-7843bcb/>>, accessed: 09/04/2024.

44. Nguyen. M. D., Le A. H., Trinh T.H., Nguyen T.V., Trinh D.K., Cao T.H., Dang D.H., 2022, Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của 2 chủng *Arthrospira (Spirulina) platensis* DL và TL của Việt Nam. *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2022*, tr.1026–1031.
45. Do V.H., 2015, Lưu giữ giống và nuôi tảo sinh khối ở Đà Loan. Sở Nông nghiệp & Phát triển nông thôn tỉnh Quảng Ninh, <<https://www.quangninh.gov.vn/So/sonongnghiep/Trang/ChiTietTinTuc.aspx?nid=5064>>.
46. Palframan R, Gibson GR, Rastall RA.n.d. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides., *Lett Appl Microbiol*, 37, pp. 281- 284.
47. Li Y., Yuan W., Zhang Y., Liu H., Dai X., 2021, Single or combined effects of dietary arabinoxylan-oligosaccharide and inulin on growth performance, gut microbiota, and immune response in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Journal of Oceanology and Limnology*, 39, pp. 741–754.
48. Gui J., Tong W., Huang S., Liang X., Fang Z., Wang W., Zhang Y., 2019, Effects of *Chlorella vulgaris* polysaccharides accumulation on growth characteristics of *Trachemys scripta elegans*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, pp. 1304–1313.
49. Mattila-Sholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M., 2002, Technological challenges for future probiotic foods, *International Dairy Journal*, 12, pp. 173–182.
50. Avendaño RE., Riquelme CE., 1999, Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae: Probiotics and microalgae and bivalve larvae *R E Avendaño & C E Riquelme, Aquaculture Research*, 30, pp. 893–900.
51. Cantú-Bernal S., Domínguez-Gámez M., Medina-Peraza I., Aros-Uzarraga E., Ontiveros N., Flores-Mendoza L., Gomez-Flores R., Tamez-Guerra P., González-Ochoa G., 2020, Enhanced Viability and Anti-rotavirus Effect of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus plantarum* in Combination With *Chlorella sorokiniana* in a Dairy Product, *Frontiers in Microbiology*, 11, 875.
52. Kazemeini H., Azizian A., Ahmadi K., 2023, Preparation of Synbiotic Yogurt Sauce Containing *Spirulina platensis* Microalgae Extract and Its Effect on the Viability of *Lactobacillus acidophilus*. *BioMed Research International*, pp. 843- 865.
53. Çelekli A., Alslibi ZA., Bozkurt H., 2019, Influence of incorporated *Spirulina platensis* on the growth of microflora and physicochemical properties of ayran as a functional food, *Algal Research*, 44, 101710.

54. Babich O., Ivanova S., Michaud P., Budenkova E., Kashirskikh E., Anokhova V., Sukhikh S., 2024, Fermentation of micro- and macroalgae as a way to produce value-added products, *Biotechnology Reports*, 41, pp. 800- 827.
55. Marco Castro E de., Shannon E., Abu-Ghannam N., 2019, Effect of Fermentation on Enhancing the Nutraceutical Properties of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*), *Fermentation 2019, Vol. 5, Page 28*, 5, pp. 28.
56. Pereira AG., Otero P., Echave J., Carreira-Casais A., Chamorro F., Collazo N., Jaboui A., Lourenço-Lopes C., Simal-Gandara J., Prieto MA., 2021, Xanthophylls from the Sea: Algae as Source of Bioactive Carotenoids, *Marine Drugs 2021, Vol. 19, Page 188*, 19, pp. 188.
57. Suganya T., Varman M., Masjuki H.H., Renganathan S., 2016, Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, pp. 909–941.
58. Kaga Y., Kuda T.T.M., Yamaguchi Y., Takenaka H., Takahashi H., Kimura B., 2021, The effects of fermentation with lactic acid bacteria on the antioxidant and anti-glycation properties of edible cyanobacteria and microalgae, *LWT*, 135, pp. 110029.
59. Do Q.T., Vu V.H., Luu T.A., 2022, Phân lập và xác định đặc tính của vi khuẩn bản địa cho sản xuất chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản ở Bạch Long, tỉnh Nam Định. *Can Tho University Journal of Science*, 58, pp. 94–101.
60. Fitri S., Gunawan P., Vania Q., 2022, Quantification of Lactic Acid as Secondary Metabolite of Lactic Acid Bacteria Isolated from Milk and Its Derivated Products, *6th FiAC 2020 - The Food Ingredient Asia Conference (FiAC)*, pp. 132–136.
61. Sylwia Ś., Elżbieta K., 2020, Algae *Chlorella vulgaris* as a factor conditioning the survival of *Lactobacillus* spp. in adverse environmental conditions. *LWT*, 133, pp.109936.
62. Huebner J., Wehling RL., Hutkins RW., 2007, Functional activity of commercial prebiotics, *International Dairy Journal*, 17, pp. 770–775.xue
63. Szczerbiec D., Piechocka J., Głowacki R., Torzewska A., 2022, Organic Acids Secreted by *Lactobacillus* spp. Isolated from Urine and Their Antimicrobial Activity against *Uropathogenic Proteus mirabilis*, *Molecules*, 27, pp. 5557.
64. Kahraman I. O., Bağdat E. S., Yalçın D., 2022, Evaluation of prebiotic, probiotic and synbiotic potentials of microalgae, *Food and Health*, 8, pp. 161-171.
65. Nguyen T., 2019, Sử dụng kết hợp men vi sinh hiệu quả hơn trong nuôi tôm thẻ. Công Ty TNHH KTCN Khoa Học Xanh, <<https://khoahocxanh.com/su->

dung-ket-hop-men-vi-sinh-hieu-qua-hon-trong-nuoi-tom/>, accessed: 09/04/2024.

66. Rezvani F., Ardestani F., Najafpour G., 2017, Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture, *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, pp. 251–258.
67. Ghoul M., Minet J., Bernard T., Dupray E., Cormier M., 1995, Marine macroalgae as a source for osmoprotection for *Escherichia coli*, *Microbial Ecology*, 30.
68. Setlow P., Wang S., Li Y-Q., 2017, Germination of Spores of the Orders *Bacillales* and *Clostridiales*, *Annual Review of Microbiology*, 71, pp. 459–477.
69. Nguyen P.T., 2021, Evaluation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria strains isolated from “nem chua Thu Duc.” *The Journal of Agriculture and Development*, 20, pp. 62–68.
70. Dang T.H., Dang H.S., Nguyen L.A., 2022, Assessment of prebiotic property of some Vietnam’s agro products and their applicability. *Vietnam Journal Biotechnol*, 20(4), 675–681.
71. Hoseinifar SH., Sun Y.Z., Caipang C.M., 2017, Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view, *Aquaculture Research*, 48, pp. 1380–1391.

PHỤ LỤC

Trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn P2:

TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTT
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGG
GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCA
TGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCG
CGGCGCATTAGCTAGGTGGTGAGGAAACGGCTCACCAAGGAAAAGATG
CGTAGCCGACCTGAGAAGGGTGATCGGCCACCACTGG
GACTGAGAAACCGGCCAGACTCCTTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGT
TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTGAGT
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTAC
GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGG
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GACAGAACAAGGGCACCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAA
TCTGTTCTCNAGTTCGGAACCCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG
TCGGTGAGGTAACCTTTAGGAGCCAGCCGCCGAANNNNCCAGA

Trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn P4:

GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCAT
GGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGC
GGCGCATTAGCTAGTGGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATN
GCGTAGCCGACCTGAGAGGCGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATC
GTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC
ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA
CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGTTAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACNNCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATC
CTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAATGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTTACAATGGACAGAACAAA
GGGCACCGAAACCGCGCAGGTAAACCAATCCACAAATCNTGTTCTCA
TGTTTCGGAACGCAATCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT
AACCTTTATGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGAC



Enhancement of Bioactive Compounds and Survival of *Lactobacillus acidophilus* Grown in the Omega-6, -7 Riched Cyanobacteria *Spirulina platensis*

Phuong Ha Hoang^{1,3} · Minh T. Nguyen^{1,3} · Hoai Thu T. Ngo¹ · Nhat Huy Chu^{1,3} · Phuong Thu Ha^{2,3} · Huong Giang Bui^{1,3} · Linh Hang To⁴

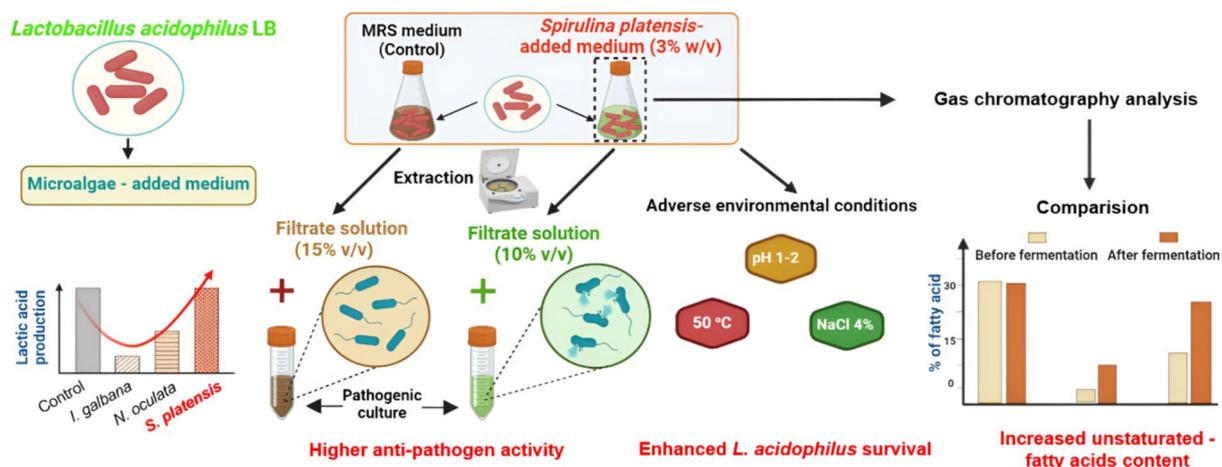
Received: 5 February 2024 / Accepted: 20 August 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

Lactobacillus acidophilus is a probiotic commonly used in aquaculture to enhance the growth and immune system of aquatic species through the synthesis of various enzymes, and antimicrobial compounds like lactic acid. Traditional method of growing *L. acidophilus* involves using the De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) medium. However, *L. acidophilus* belongs to a non-spore forming group, which make it vulnerable to stress conditions, especially during the usage process. Therefore, the present study aimed to improve the survival rate, antibacterial activity, and enrich the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) content of *L. acidophilus* LB when cultured in an algae-supplemented medium, thus increasing its benefits in aquaculture applications. Using different algae biomass species as an alternative to MRS medium for the growth of *L. acidophilus* LB, the results showed that *Spirulina platensis* promoted the highest density of *L. acidophilus* LB. When grown in (*S. platensis* + glucose) medium, *L. acidophilus* LB produced the highest lactic acid concentration of 18.24 ± 2.43 mg/mL and survived in extreme conditions such as 4% NaCl, pH 1.0–2.0, and 50 °C, and inhibited $99.82 \pm 0.24\%$ of *Vibrio parahaemolyticus* population after 2 days of treatment. Additionally, it was observed that the PUFAs content, specifically omega-6, and -7, also increased in the fermentation mixture as compared to the control sample. These findings highlighted the potential of utilizing the cyanobacteria *S. platensis* as an alternative, eco-friendly growth substance for *L. acidophilus* LB to enhance its bioactivity and viability under extreme conditions.

Graphical Abstract



Ha Phuong Hoang and Minh T. Nguyen these authors are contributed equally to this work.

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

Lactobacillus, a probiotic genus, secretes organic acids like lactic acid, acetic acid, and hydrogen peroxide under certain fermentation conditions, showing strong antimicrobial effects against various pathogens [1]. Therefore, it serves as an environmentally friendly substitute for antibiotics in preventing the spread of pathogen in shrimp farming [2]. Moreover, *Lactobacillus* strains can produce a range of enzymes, including proteases, fructanases, and amylases. These enzymes play crucial roles in the digestion of complex food substances into bioactive compounds. Specifically, they break down proteins into amino acids [3] and fermentable carbohydrates like fructans and starch into short-chain fatty acids (SCFAs) [4], which are readily absorbed by the host animal, thereby enhancing health [5, 6]. A study by Chiu et al. demonstrated that adding *Lactobacillus pentosus* BD6 at a concentration of 10^9 CFU/kg to the diet significantly enhanced growth, feed efficiency, and disease resistance in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) compared to a control group without probiotics [7]. Another study found that feeding shrimp with *Lactobacillus* at 10^7 CFU/g diet increased their weight significantly after 27 days [8]. Therefore, there is an increasing demand for the production of the *Lactobacillus* biomass. The MRS medium is favored for cultivating *Lactobacillus* strains at a lab scale due to its nutrient-rich composition, including yeast extract, peptone, meat extract, and various inorganic salts. However, its high cost hinders its use in large-scale production [9]. The price and quality of probiotic products depend on the microbial strains, culture conditions, and the composition of the fermentation environment. In some studies, agricultural by-products such as cheese whey, corn steep liquor, and cabbage liquor have been experimentally used to prepare *Lactobacillus* culture medium on an industrial scale [10, 11]. However, the addition of yeast extract, peptone, or meat extract is still necessary to maintain the growth of bacteria in these medium comparable to that in the MRS medium [12, 13]. Thus, despite these alternatives, the cost of the biomass production of *Lactobacillus* may not be significantly reduced. *Lactobacillus*, being non-endospore forming, is known to be particularly vulnerable to harsh environments, affecting their viability during production and application [14]. For instance, exposing *L. plantarum* KLDS 1.0628 to 55 °C for an hour can decrease its survival by over 95% [15]. Additionally, high salt conditions led to the disappearance of nine out of ten *Lactobacillus* species in mice guts [16]. Thus, identifying cost-effective substrates that enhance growth, activity, and survival of *Lactobacillus* during fermentation is essential to explore

practical and industrial-scale applications of the probiotic in aquaculture.

Algae are traditionally considered a rich nutritional source of protein, essential amino acids, vitamins, minerals, and trace elements to supplement the aqua feed [17]. Many species of algae can synthesize essential polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially γ -linoleic acid (GLA, C18: 3n-6), linoleic acid (C18: 2n-6), eicosapentaenoic acid (EPA, C20: 5n-3), docosahexaenoic acid (DHA, C22: 6n-3) and arachidonic acid (AA, C20: 4n-6) which mostly are incapably produced by aquatic animals [18]. Research indicates algae as a potential prebiotic source that can enhance probiotic growth [19]. Sylwia et al. found that incorporating algae biomass into *Lactobacillus* cultures increases bacterial viability, acid resistance, and preserves omega-3 content after fermentation [20].

Therefore, in this study, the dried algae powder was tested as the sole nutrient source for culturing *L. acidophilus* LB to potentially lower the cost of the bacterial biomass production and initially develop a bioproduct with improved probiotic activity and essential polyunsaturated fatty acids from algae biomass that could benefit shrimp farming activity. Specifically, the effectiveness of algae supplementation in increasing lactic acid production, enhancing anti-*Vibrio parahaemolyticus* activity, and providing the *L. acidophilus* LB with resilience ability against harsh conditions such as high temperatures, low pH, or salinity will be assessed. MRS medium serves as the standard, demonstrating that *L. acidophilus* LB cultured in algae-supplemented medium can achieve growth and probiotic qualities comparable to those cultivated in the nutrient-rich MRS medium, traditionally regarded as optimal for lactobacilli cultivation. Moreover, this study will evaluate the variations in concentrations of critical polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as omega-6 and omega-7, within the fermentation mixture, as these are valuable nutrients for the growth of aquatic animal.

Material and Methods

Bacteria and Algae Strains

The strain *Lactobacillus acidophilus* LB (GenBank accession nos. OK398226.1) was obtained from the Environmental Bioremediation Lab., Institute of Biotechnology, VAST. *L. acidophilus* LB was cultured in the Rogosa and Sharpe (MRS) medium (CAS no. 69966, Sigma-Aldrich). The pathogen *Vibrio parahaemolyticus* VTCC 910192, provided by the Vietnam Type Culture Collection, was activated in the Thiosulfate–citrate–bile salts–sucrose (TCBS, Sigma-Aldrich, UK), then subcultured in Luria–Bertani broth (Sigma-Aldrich, UK) for further use in the experiments [21].

The marine microalgae *Isochrysis galbana* (Genbank accession no. FJ536744), *Nannochloropsis oculata* (Genbank accession no. GU220364), and cyanobacteria *Spirulina platensis* BM belongs to a collection of Algal Biotechnology Department, Institute of Biotechnology, VAST. The marine microalgae were cultivated in Erdcheiber medium [22], and *Spirulina plaensis* BM was cultivated in SOT medium [23], in a semi-batch regime. The biomass was harvested by centrifugation and washed with tap water to remove salt, dried at 40 °C for 48 h, and then stored at –20 °C until use. Throughout this study, the algae-containing medium was prepared by suspending the algae biomass in a phosphate buffer solution (PBS, pH 7), and autoclaving the medium at 121 °C, 15 psi for 30 min to prevent the bacteria contamination in the medium. The concentration of algae in the medium was changed depending on the purpose of the experiments.

During the fermentation of *L. acidophilus* LB, bacterial purity was ensured by regularly plating samples of the fermentation liquid on MRS agar and incubating at 35 °C for 48 h. Purity was confirmed if colonies on the agar resembled those of a pure *L. acidophilus* LB culture, with no foreign colonies present.

L. acidophilus LB Culture in the Algae-Containing Medium

The marine microalgae powder, including *I. galbana*, *N. oculata*, and cyanobacteria *S. platensis* was dispersed separately in PBS at different concentrations of: 3.0; 3.5; 4.0, and 5.0% (w/v). The newly activated *L. acidophilus* LB with a density of about 10⁸ CFU/mL was inoculated in either MRS or each of the above-prepared algae-containing medium at a ratio of 5% (v/v). *L. acidophilus* LB was isolated by the author from shrimp farming and showed an optimal growth temperature of 35 °C. Therefore, 35 °C was the temperature applied for the growth of *L. acidophilus* LB in this study. The prepared cultures were grown anaerobically for 5 days. The negative control was mediums without bacteria. Samples were withdrawn daily to assess the bacterial density and secreted lactic acid concentration. The cell density was calculated based on the plate count method and expressed as a logCFU/mL. The lactic acid content in bacterial culture was measured by a high-performance liquid chromatography system equipped with a UV detector at 210 nm. During the analysis process, the 5 mM H₂SO₄ was used as the mobile phase in a Rezex ROA (300×7.8 mm, Phenomenex) column at a flow rate of 0.4 mL/min and temperature of 60 °C.

Effect of Carbon Sources on Lactic Acid Production by L. Acidophilus LB

To determine the effect of carbon sources on the production of lactic acid by *L. acidophilus* LB, different carbon sources

(glucose, saccharose, fructose, and molasses) were added at a concentration of 2% (w/v) to the algae-containing medium (3%, w/v). A 5% (v/v) *L. acidophilus* LB culture (with a density of about 10⁸ CFU/mL) was inoculated in the prepared medium and incubated at 35 °C for 4 days. The samples were collected daily to check for lactic acid concentration. The control samples were *L. acidophilus* LB culture in MRS broth and algae-containing medium without the addition of external carbon sources.

Salinity Tolerance

Lactobacillus acidophilus LB suspension, with a concentration of about 10⁸ CFU/mL, was cultured in *S. platen-sis* (3% w/v) + Glucose (2%, w/v) (AG) medium and MRS medium with varying NaCl concentrations (0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0% w/v) to assess the protective effect of *S. platensis* on *L. acidophilus* LB under high salinity conditions. The cultures were incubated statically at 35 °C. The growth of *L. acidophilus* LB in these salt-supplemented AG and MRS media was determined by measuring the bacterial density after 4 days of culture. In the control experiment, *L. acidophilus* LB was cultured in corresponding media without the addition of NaCl.

Acid Tolerance

L. acidophilus LB was grown in an MRS medium to a density of 10⁸ CFU/mL, and then centrifuged at 8000 rpm for 2 min to remove the supernatant. The pH of MRS and AG media was adjusted to 1, 2, 3, or 4 using 1N HCl and inoculated with the prepared bacteria. The MRS and AG media with pH 7 served as controls. Cultures were incubated at 35 °C then samples were taken at 1, 2, and 3 h. After centrifugation, the bacterial pellets were resuspended in phosphate buffer (pH 7) and diluted to check viability.

Heat Shock Tolerance

L. acidophilus LB was cultured in MRS or AG medium to reach the density of approximately 10⁸ CFU/mL. Then each of these bacterial suspensions was transferred to different Eppendorf tubes and placed in a water bath at three different temperatures of 40, 45, and 50 °C. After 15 min, treatment was stopped immediately by placing the tubes on ice for 5 min. The culture maintained at 35 °C served as control. The survival rate of *L. acidophilus* LB in each treatment was estimated according to the following equation [24]:

$$\text{Survivalrate(\%)} = \frac{\log\text{CFU/mL after treatment}}{\log\text{CFU/mL before treatment}} \times 100\%$$

Antimicrobial Activity

The effect of *S. platensis* addition on the antimicrobial activity of *L. acidophilus* LB was determined by the broth dilution method [25]. Briefly, *L. acidophilus* LB was inoculated concurrently in MRS and algae-added medium (*S. platensis* (3% w/v) + glucose (2%, w/v)) and grown at 35 °C for 4 days. Next, the cell-free suspension (CFS) of these two cultures, named CFS-M and CFS-S, respectively, was prepared by centrifuging these cultures at 10,000 rpm for 5 min and filtered through a 0.22 µm syringe filter (Millex-GV filter, Millipore). In the present study, pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* was used to test the antimicrobial activity of *L. acidophilus* LB. Overnight pathogenic bacteria was inoculated (2% v/v) in fresh LB broth and seeded in multiple eppendorf tubes (100 µL per tube). The collected CFS was then diluted with LB broth and pipetted into these prepared tubes (100 µL per tube) to obtain different CFS concentrations of 0, 1, 5, 7.5, 10, 15, or 20% (v/v). In the positive control, oxytetracycline antibiotics at a stock concentration of 10 mg/L were added to the *V. parahaemolyticus* cultures instead of the CFS solution. In contrast, in the negative control, the bacteria were grown in the LB medium without antibiotics and CFS supplements. The tubes were incubated at 35 °C for 48 h. Pathogen growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (UV-1601 Spectrophotometer, Shimadzu, Japan). Additionally, a similar experiment procedure was also carried out with the filtered *S. platensis* supernatant to evaluate the anti-*V. parahaemolyticus* activity of the *S. platensis*. The antimicrobial activity was expressed as inhibition (%) of *V. parahaemolyticus* growth in CFS-added samples compared to the control via the equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100\%$$

where Ac is the average of bacteria turbidity of the negative controls, and At is the average of bacteria turbidity of the treatment sample.

Gas Chromatography Analysis (GS)

The fatty acid profiles of three samples were analyzed: *L. acidophilus* LB biomass cultured in MRS medium, *S. platensis* biomass, and the fermentation mixture of *L. acidophilus* LB and *S. platensis* biomass. The analysis was conducted using a 7890A gas chromatograph from Agilent, with the conditions specified by Colantoni et al. [26]. Briefly, the sample was injected into the SBP-2331 capillary columns (Sigma-Aldrich) and used helium as the

carrier gas (linear velocity of 36.26 cm/s). A 5975C mass spectrometer (Agilent) was used to record the generated mass spectra from 45 to 450 m/z and 240 °C. Each peak generated was compared to the NIST 17.L mass spectral library to identify the corresponding compound.

Statistical Analysis

All experiments were done in three biological replicates ($n = 3$). The result was expressed as mean \pm standard deviation (SD). The statistical significance was determined by a two-tailed Student's *t*-test that was performed in SigmaPlot version 12.0, $P < 0.05$ was considered an indicator of statistical significance. Additionally, the statistical significance of differences among more than three groups was determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) test.

Results

Growth and Lactic Acid Production of *L. acidophilus* LB in Different Algae Inclusion

Table 1 shows the density of *L. acidophilus* LB during a 5-day incubation period. Regardless of the type of algae used, the growth of *L. acidophilus* LB increased with time, reaching its maximum density on the 4th day, followed by a decrease on the 5th day. The PBS medium with 3% *S. platensis* showed the highest bacteria density of 10.82 ± 0.38 log (CFU/mL) on the 4th day. This value was almost the same as the cell density of 9.57 ± 1.16 log(CFU/mL) in the MRS medium ($P > 0.05$). When the *S. platensis* concentration was increased to 3.5%, the density of *L. acidophilus* LB was not different from the medium containing 3% of *S. platensis*. However, when the *S. platensis* concentration was increased 4% and 5%, the density of *L. acidophilus* LB increased to over 11 log(CFU/mL), which was significantly higher than in other tested mediums. On the other hand, *L. acidophilus* LB was able to grow in a medium containing *I. galbana* and *N. oculata*, but the bacterial density was lower compared to the MRS culture at the same incubation time.

The study also assessed *L. acidophilus* LB's lactic acid production. Results indicated the absence of lactic acid in the *I. galbana* + PBS medium, whereas *N. oculata* and *S. platensis* mediums saw lactic acid concentrations peak at 2.91 and 6.85 ± 0.20 mg/mL, respectively, after 4 days. These figures were markedly lower than the 17.5 ± 1.03 mg/mL achieved in MRS medium. Additionally, no significant change in lactic acid levels was observed with increased algae biomass concentration. Thus, a 3% *S. platensis* biomass concentration (Table 2) was identified as optimal for enhancing *L. acidophilus* LB's lactic acid production.

Table 1 Bacterial density of *L. acidophilus* LB grew in the culture medium supplemented with different types and concentrations of dried algae biomass (Log(CFU/mL))

Algae content	Day 0	Day 1st	Day 2nd	Day 3rd	Day 4th	Day 5th
<i>Control—L. acidophilus</i> LB cultured in MRS medium (Log(CFU/mL))						
0%	5.09 ± 0.23	6.32 ± 0.44	8.73 ± 0.17	10.26 ± 0.41	10.57 ± 1.16	8.39 ± 0.65
<i>L. acidophilus</i> LB cultured in (<i>I. galbana</i> + PBS) medium (Log(CFU/mL))						
3%	5.12 ± 0.51	5.82 ± 0.06	7.62 ± 0.27*	8.88 ± 0.11*	9.73 ± 0.41*	8.03 ± 0.58
3.5%	5.34 ± 0.87	6.45 ± 0.03	7.94 ± 0.65*	9.54 ± 0.83*	9.99 ± 0.55*	8.45 ± 1.66
4%	5.84 ± 0.98	6.69 ± 0.50	8.13 ± 1.54*	9.25 ± 0.71*	9.93 ± 0.37*	7.99 ± 0.64
5%	5.92 ± 0.29	6.15 ± 0.72	8.35 ± 0.04	9.93 ± 0.90	10.13 ± 0.73	8.98 ± 0.40
<i>L. acidophilus</i> LB cultured in (<i>N. oculata</i> + PBS) medium (Log(CFU/mL))						
3%	5.16 ± 0.64	6.56 ± 1.19	7.92 ± 0.46*	8.05 ± 0.23*	8.76 ± 0.04*	7.39 ± 0.08*
3.5%	5.22 ± 0.63	6.81 ± 0.90	7.03 ± 0.89*	8.93 ± 1.11*	8.68 ± 0.02*	8.90 ± 1.53
4%	5.56 ± 0.39	6.45 ± 0.98	6.78 ± 1.53*	8.56 ± 0.72*	9.64 ± 0.03*	9.02 ± 0.75*
5%	5.75 ± 0.09	6.89 ± 0.55	7.77 ± 0.94*	9.20 ± 0.84*	9.37 ± 0.09*	8.72 ± 0.14
<i>L. acidophilus</i> LB cultured in (<i>S. platensis</i> + PBS) medium (Log(CFU/mL))						
3%	5.69 ± 0.49	7.02 ± 0.01*	9.17 ± 0.45*	10.42 ± 0.39	10.82 ± 0.38	9.01 ± 0.68*
3.5%	5.38 ± 0.54	7.05 ± 0.09*	9.67 ± 0.12*	10.45 ± 0.11	10.49 ± 0.37	10.13 ± 0.49*
4%	5.88 ± 0.62	8.73 ± 1.12*	9.40 ± 0.69*	9.66 ± 0.78*	11.16 ± 0.28*	10.21 ± 0.44*
5%	5.59 ± 0.43	9.00 ± 0.45*	9.58 ± 0.42*	10.26 ± 0.49	11.00 ± 0.73*	10.78 ± 0.46*

Values are expressed as mean ± SD (n=3). Within a column, the asterisks (*) symbol represents P < 0.05 versus the control sample

Table 2 Lactic acid production of *L. acidophilus* LB grew in the culture medium supplemented with different types and concentrations of dried algae biomass (mg/mL)

Algae content	Day 1st	Day 2nd	Day 3rd	Day 4th	Day 5th
<i>Control—L. acidophilus</i> LB cultured in MRS medium (mg/mL)					
0%	12.60 ± 0.47	14.40 ± 0.94	14.81 ± 0.84	17.53 ± 0.13	12.60 ± 0.60
<i>L. acidophilus</i> LB cultured in (<i>I. galbana</i> + PBS) medium (mg/mL)					
3%, 3.5%, 4% or 5%	-				
<i>L. acidophilus</i> LB cultured in (<i>N. oculata</i> + PBS) medium (mg/mL)					
3%	-	-	1.02 ± 0.24*	2.54 ± 0.51*	2.32 ± 0.02*
3.5%	-	-	0.98 ± 0.83*	2.91 ± 0.59*	2.88 ± 0.33*
4%	-	-	0.75 ± 0.26*	2.91 ± 0*	2.45 ± 20*
5%	-	-	1.22 ± 0.61*	2.91 ± 0*	2.72 ± 0.84*
<i>L. acidophilus</i> LB cultured in (<i>S. platensis</i> + PBS) medium (mg/mL)					
3%	2.96 ± 1.05*	3.32 ± 0.40*	3.86 ± 0.63*	4.26 ± 0.19*	3.78 ± 1.46*
3.5%	2.54 ± 0.96*	2.87 ± 0.65*	3.05 ± 0.85*	3.48 ± 1.89*	3.38 ± 1.16*
4%	2.60 ± 0.34*	3.03 ± 1.35*	3.62 ± 0.64*	4.20 ± 1.36*	3.86 ± 0.95*
5%	2.95 ± 0.89*	3.79 ± 0.17*	5.13 ± 1.36*	6.85 ± 0.20*	6.06 ± 1.23*

Values are expressed as mean ± SD (n=3). Within a column, the asterisk (*) represents P < 0.05 versus the control sample. "-" means not detected

Effect of External Carbon Sources Addition on the Lactic Acid Production of *L. acidophilus* LB

Figure 1 depicted an improvement in lactic acid production in algae-containing medium when an external carbon was added. The amount of lactic acid produced depends on the types of algae used. The highest lactic acid concentration of 18.24 ± 2.43 mg/mL was observed in the medium

containing 3% *S. platensis* and 2% glucose. This value was found to be similar to the value of 19.13 ± 4.46 mg/mL obtained in MRS culture (P > 0.05). However, the lactic acid concentration in the medium containing *I. galbana* and *N. oculata* remained low at 3.01 ± 0.70 and 9.92 ± 1.20 mg/mL, respectively. Thus, further investigation was carried out to study the effect of *S. platensis* on the probiotic characteristic of *L. acidophilus* LB.

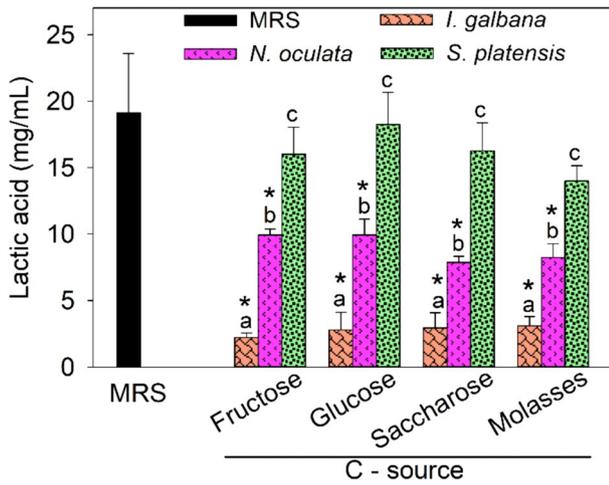


Fig. 1 Increase in lactic acid production due to the addition of an external C-source in the algae-containing medium after 4 days of incubation. Values are expressed as mean ± SD (n=3). The asterisk symbol (*) represents P<0.05 versus in MRS culture, which determined with the two-tailed Student’s t-test. Within a type of algae-added medium, statistical significance was determined by the one-way ANOVA test, values with different letters indicate significant differences among samples

Salinity Tolerance of *L. acidophilus* LB in the Presence of *S. platensis*

Different concentrations of NaCl (0, 1.5, 2.0, 3.0, and 4%) was used to evaluate the effect on the growth of *L. acidophilus* LB. As presented in Fig. 2, at 0 h, the initial bacterial density was around 6.07 ± 0.42 to 6.87 ± 0.24 logCFU/

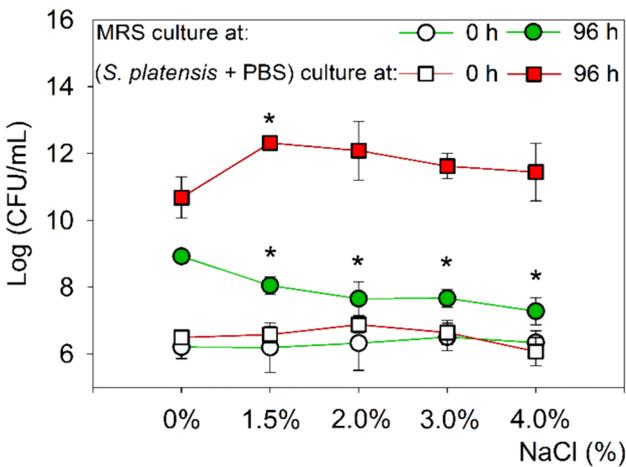


Fig. 2 The impact of *S. platensis* supplement on *L. acidophilus* LB in high salinity conditions. Values are expressed as mean ± SD (n=3). Within a type culture medium, the two-tailed Student’s t-test was used to verify the significant difference in the bacteria density under salt-added conditions versus freshwater conditions, (*) indicated P<0.05

mL in each treatment, without significantly different. After 4 days of incubation in MRS culture, the bacteria density increased to 8.92 ± 0.20 logCFU/mL. However, the addition of salt partially inhibited bacterial growth, resulting in a cell population reduction to 8.04 ± 0.27 logCFU/mL in (MRS + 1.5% NaCl) medium. Interestingly, the presence of *S. platensis* biomass shifted the optimal salinity condition for *L. acidophilus* LB growth to 1.5% NaCl. The highest bacterial density of 12.31 ± 0.01 logCFU/mL was measured in the (*S. platensis* 3% + NaCl 1.5%) culture, which was about 1.5 times higher than that of (MRS + NaCl 1.5%) culture. Moreover, the *S. platensis* were able to protect *L. acidophilus* LB at an extreme salinity concentration of 4%. Bacterial growth in (*S. platensis* 3% + NaCl 4%) was similar to that of no salt-added medium (P>0.05).

Survival Rate of *L. acidophilus* LB Cultured in *S. platensis*—Containing Medium Under Heat-Shock Condition

Figure 3 indicates that *L. acidophilus* LB was able to survive without significant cell loss after being heat shock at 40 °C, compared to the bacterial survival rate of the untreated sample which remained above 99% for both MRS and *S. platensis*-added cultures. Exposure to 45 °C significantly reduced *L. acidophilus* LB’s survival rate in MRS medium to 89.30 ± 3.12%, whereas in the medium supplemented with *S. platensis* biomass, the bacterial cell count remained stable. Heat-shocked MRS culture at 50 °C resulted in the complete death of all bacterial cells. Although the surviving percentage decreased to 54.12 ± 0.71%, a viable cell count of 5.72 ± 0.07 logCFU/mL was measured in *S.*

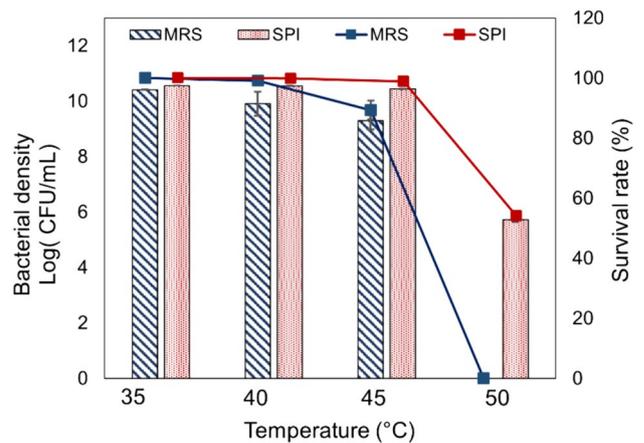


Fig. 3 Bacterial density (bar) and survival rate (line) of *L. acidophilus* LB heat-shocked to 35, 40, 45, and 50 °C in *S. platensis* – containing culture (SPI) and MRS culture (MRS). Values are expressed as mean ± SD (n=3). Statistical significance was determined with Student’s t-test, the asterisk symbol (*) represents P<0.05 versus the survival rate at 35 °C

platensis—added medium after being heat-shocked at 50 °C (Table 2).

Effect of *S. platensis* Biomass Addition on the Survival Rate of *L. acidophilus* LB in Extremely Acidic Condition

The acid tolerance capability of *L. acidophilus* LB was tested in MRS and *S. platensis*—containing medium at different pH levels. The experimental results showed that the pH value of each treatment did not significantly change during the experiment (Table S1). At the lowest pH level of 1, *L. acidophilus* LB was not viable in MRS culture after 2 h of treatment (Table 3). On the contrary, in *S. platensis*—containing medium, the bacterial density was remained at $2.45 \pm 0.32 \log(\text{CFU/mL})$ even after 3 h of treatment. At pH 2, higher viability was also observed in medium with algae, achieving $3.85 \pm 0.65 \log(\text{CFU/mL})$ after 3 h. Although the number of bacteria in the two mediums at pH 3 was similar in the first hour, the bacterial density in the MRS medium was considerably reduced with an increase in incubation time to 2 and 3 h. On the other hand, the survival of *L. acidophilus* LB in the *S. platensis* medium was stable even after 3 h of treatment.

Enhanced Anti-*V. parahaemolyticus* Activity of *L. acidophilus* LB Cultured in *S. platensis* – Containing Medium

Table 4 demonstrates that the cell-free solution derived from (*S. platensis* 3% + glucose 2%) culture (CFS-S) has strong antimicrobial activity against pathogenic *V. parahaemolyticus*. Different concentrations (1–20%) of CFS-S were added to the culture of *V. parahaemolyticus*, and the results revealed that the higher the CFS-S concentration the more pathogenic bacteria were inhibited (Table 4). At a concentration of 7.5% CFS-S, there was a significant reduction of $79.17 \pm 13.62\%$ in the growth of *V. parahaemolyticus*. The inhibition percentage increased to $97.84 \pm 1.08\%$ for the 10% CFS-S treatment. At a concentration of 15% and above, CFS-S inhibited over 99% of pathogenic growth. The antibacterial potency of CFS-S (7.5% v/v) was found to be comparable to that of oxytetracycline at a concentration of 0.75 mg/L in this experiment. On the other hand, treatment with a CFS-M concentration of 7.5% only inhibited pathogenic growth by $15.44 \pm 3.11\%$. The inhibitory effect of *S. platensis* supernatant against *V. parahaemolyticus* was below 15% at all tested concentrations.

Table 3 Viability of *L. acidophilus* LB at different pH when grew in MRS or the *S. platensis* (3%) – containing medium

	<i>L. acidophilus</i> LB in MRS medium				<i>L. acidophilus</i> LB in <i>S. platensis</i> (3%)-containing medium			
	pH 7	pH 3	pH 2	pH 1	pH 7	pH 3	pH 2	pH 1
0	8.20 ± 0.5				8.00 ± 0.32			
1 h	8.20 ± 1.49 ^a	8.10 ± 0.11 ^a	2.38 ± 0.58 ^{*a}	1.34 ± 1.28 ^{*a}	8.37 ± 0.45 ^a	7.80 ± 1.38 ^a	3.50 ± 0.72 ^{*b}	3.26 ± 0.35 ^{*b}
2 h	8.29 ± 2.16 ^a	2.30 ± 3.99 ^{*a}	1.60 ± 1.40 ^{*a}	–	8.35 ± 1.02 ^a	8.49 ± 1.51 ^b	4.41 ± 0.28 ^{*b}	2.72 ± 1.05 [*]
3 h	8.42 ± 2.30 ^a	2.23 ± 1.07 ^{*a}	0.83 ± 1.43 ^{*a}	–	8.24 ± 1.58 ^a	7.13 ± 1.84 ^b	3.85 ± 0.65 ^{*b}	2.45 ± 0.32 [*]

Values are expressed as mean ± SD (n=3). Within a column, the asterisks symbol (*) represents P < 0.05 versus the sample at 0 h. Additionally, under a specific pH condition, values with different letters indicate significant differences in the density of bacteria that grew in *S. platensis*-containing medium compared to MRS medium. “-” means not detected

Table 4 Inhibition effect of the cell-free suspension of *L. acidophilus* LB cultured in MRS (CFS-M) or the *S. platensis*—containing medium (CFS-S) against the *V. parahaemolyticus* pathogen

Growth inhibition (%)	Concentration of antibacterial agent in <i>V. parahaemolyticus</i> culture (% v/v)					
	1%	5%	7.5%	10%	15%	20%
Oxytetracycline (10 mg/L)	19.51 ± 6.91 ^a	96.36 ± 0.93 ^a	97.60 ± 0.74 ^a	97.79 ± 0.15 ^a	97.70 ± 0.45 ^a	98.22 ± 0.44 ^a
Supernatant of <i>S. platensis</i> (without <i>L. acidophilus</i> fermentation)	4.61 ± 3.60 ^b	5.74 ± 2.04 ^b	5.88 ± 1.25 ^b	7.94 ± 1.59 ^b	10.25 ± 0.83 ^b	11.52 ± 2.23 ^b
CFS-M	8.62 ± 4.0 ^b	21.32 ± 5.58 ^c	15.44 ± 3.11 ^c	99.82 ± 0.24 ^a	100 ^a	100 ^a
CFS-S	4.34 ± 1.99 ^b	7.58 ± 2.88 ^b	79.17 ± 13.62 ^a	97.84 ± 1.08 ^a	99.27 ± 1.04 ^a	99.82 ± 0.24 ^a

Values are expressed as mean ± SD (n=3). Within a column, statistical significance was determined by the one-way ANOVA test, values with different letters indicate significant differences among samples

Fatty Acid Profile of Algae Biomass After *L. acidophilus* LB Fermentation

A GC analysis was conducted to compare the fatty acid profiles of three samples, including the *L. acidophilus* LB biomass cultured in MRS medium, *S. platensis* biomass, and the fermentation mixture of *L. acidophilus* LB and *S. platensis* biomass. The results presented in Table 5 demonstrate a significant variation in the abundance of fatty acid compositions between the fermentation mixture of *L. acidophilus* LB in the MRS medium and the algae-containing medium. The MRS culture predominantly contained saturated fatty acids, such as decanoic (C10:0), hexadecanoic (C16:0), and eicosanoic acids (C20:0), constituting $97.48 \pm 0.34\%$ of the total fatty acids content. However, a notable decrease in the content of decanoic acid from 83.93 ± 0.22 to $40.71 \pm 0.21\%$ TFA was observed when the bacteria were fermented in the algae-containing medium. Surprisingly, the hexadecenoic acid (C16:1n-7) was absent in the MRS culture or algae biomass, but a notable quantity of 12.53% TFA was detected in the bacteria/algae fermented mixture. This suggests that the bacteria may induce the desaturation process of the C16:0 compound to its unsaturated form during fermentation with algae biomass.

Additionally, the cultivation of *L. acidophilus* LB in the *S. platensis*-containing medium also significantly enriched the amount of linoleic acid (C18:2n-6, omega-6) in the algae biomass by 1.62 times, from 22.76 ± 0.67 to

$36.29 \pm 0.03\%$ TFA. Furthermore, other fatty acids including pentadecanoic acids (C15:2n-6), heptadecadiene acid (C17:2n-6), octadecenoic acid (C18:1n-9), and eicosanoic acid (C20:0) may have undergone conversions to different forms, leading to a decrease or absence of their content in the bacteria/algae fermented sample. These alterations significantly increased the unsaturated fatty acids (PUFAs) content to the value of $48.82 \pm 0.72\%$ TFA, which was 1.39 and 22.5 times higher compared to the MRS culture and the original algae biomass.

Discussion

This study revealed that *S. platensis* biomass enhance the growth of *L. acidophilus* LB, likely due to its rich polysaccharide and vitamin content, which bacteria easily access [27]. This supports previous findings on *S. platensis*'s role in promoting lactic acid bacteria proliferation [28]. Algae have complex cell wall structures that are difficult for bacteria to digest directly during fermentation [29]. Hydrothermal hydrolysis of algae biomass at medium–low temperatures, such as in autoclaving, increases the solubilization of algae organic matter by 8–13% and eliminates contamination from foreign bacteria [30, 31]. This pretreatment also enhances the hydrolysis of macromolecules like starch and protein into smaller molecules that bacteria can utilize [32]. Yingda et al. reported that over 85% of fatty acids and 75% of omega-3

Table 5 Fatty acid composition (% per TFA) in the fermentation mixture of *L. acidophilus* LB and *S. platensis* after 96 h

Specifications	Common name	<i>L. acidophilus</i> biomass grew in MRS medium	<i>S. platensis</i> biomass	Fermentation mixture of <i>L. acidophilus</i> LB and <i>S. platensis</i>
PUFAs (Polyunsaturated fatty acids, % TFA)		2.16 ± 0.52^a	35.14 ± 1.31^b	48.82 ± 0.72^c
C15:2n-6 Pentadecanoic acid		–	10.86 ± 0.19	–
C16:1n-7 Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid, omega-7	–	–	12.53 ± 0.69
C17:2n-6 Heptadecadiene acid		–	1.52 ± 0.46	–
C18:1n-9 Octadecenoic acid	Oleic acid, omega-9	2.16 ± 0.52	–	–
C18:2n-6 All cis-9, 12- octadecadienoic acid	Linoleic acid (LA), omega-6	–	22.76 ± 0.67	$36.29 \pm 0.03^*$
SFAs (Saturated fatty acid, % TFA)		97.48 ± 0.34^a	64.84 ± 1.86^b	51.16 ± 3.47^c
C10:0 Decanoic acid	Capric acid	83.93 ± 0.22^a	58.33 ± 0.48^b	40.71 ± 0.21^c
C15:0 Pentadecanoic acid	Pentadecylic acid	–	–	6.46 ± 1.35
C16:0 Hexadecanoic acid		9.63 ± 0.25	–	–
C18:0 Octadecanoic acid	Stearic acid	–	2.78 ± 0.78	2.06 ± 0.69
C20:0 Eicosanoic acid		3.92 ± 0.15	–	–
C24:0 Tetracosanoic acid	Lignoceric acid	–	3.73 ± 0.60	1.93 ± 1.50

Values are expressed as mean \pm SD ($n=3$). “–” means not detected. Within a row, in cases where there was a not detected value, the asterisk symbol (*) denotes $P < 0.05$ in comparison to the *L. acidophilus* biomass grew in MRS medium or the *S. platensis* biomass samples. For rows containing three values, statistical significance was determined through the one-way ANOVA test. Distinct letters in this context signify notable differences among the samples

content are retained in algae biomass after hydrothermal treatment [33]. Algae are also a potential source of prebiotics that promote probiotic growth [19]. In this study, the algae slurry produced from hydrothermal treatment is directly used in the fermentation of *Lactobacillus acidophilus* LB, creating an *L. acidophilus* LB/algae blend with enhanced probiotic activity and essential polyunsaturated fatty acids. After 4 days, the density of *L. acidophilus* LB in the *S. platensis*-enriched medium reached its peak at 10.82 ± 0.38 log (CFU/mL). The unusually long fermentation time was primarily due to a low level of *L. acidophilus* LB inoculum, which was close to 5 log CFU/mL. This amount was lower compared to other studies, where the inoculum ranged from 7 to 9 log (CFU/mL) [34, 35]. Additionally, Rezvani et al. also noted that *Lactobacillus* growth phases might differ by strain [36], explaining the longer culture time needed for *L. acidophilus* LB here. Future experiments could adjust starter culture densities to align with specific goals and scales of production. Additionally, previous studies mainly focused on examining the effect of algae addition on probiotic growth, while the information on bacterial lactic acid production is still limited. Here, it is worth noting that when glucose is added as an external carbon source to the medium containing *S. platensis*, it can produce a maximum lactic acid content of 18.24 ± 2.43 mg/mL, which was comparable to the lactic acid concentration in the MRS culture ($P > 0.05$).

Besides the improvement in the growth of *L. acidophilus* LB, the addition of *S. platensis* to the culture medium also enhances the bacterial survival rate in different adverse environments. A previous study by Zamfir et al. suggested that *L. acidophilus* prefers to grow in low salt conditions [37]. However, with the presence of *S. platensis*, the density of *L. acidophilus* LB at salinity of 4% was not significantly different from that of the control culture (no salt added). The enhancement in salt tolerance of *L. acidophilus* LB could broaden its application in both freshwater and seawater. Additionally, *L. acidophilus* LB was also able to survive in extreme environmental conditions of heat shock at 50 °C and low pH of 1–2 for 3 h when grown in the *S. platensis*-containing medium, whereas these conditions recorded the death of all *L. acidophilus* LB cells cultured in MRS medium. A study by Sylwia et al. reported that the microalgae *Chlorella vulgaris* could protect *Lactobacillus* spp. strains at pH 2.5, but a pH condition of 1.5 was the threshold for the survival of those bacteria, as no viable bacterial cells were detected in the culture medium after 1 h of treatment [20]. Thus, the present study further supports the use of *S. platensis* as an excellent growth substance for improving the survival of *L. acidophilus* LB.

Aquatic animals are vulnerable to serious diseases caused by pathogens such as *V. parahaemolyticus* [38]. This study found that *L. acidophilus* LB grown in a medium containing *S. platensis* showed a five-fold enhancement in inhibiting *V.*

parahaemolyticus compared to cultures in MRS medium, using a treatment dose of 7.5% (v/v, CFS: pathogen growth medium). *Lactobacillus* strains are known for their antibacterial effects, attributed to lactic acid production which acidifies the environment, and the release of other compounds like hydrogen peroxide and short-chain fatty acids [39]. Lactic acid production by *L. acidophilus* LB in algae-enriched medium was similar to its production in MRS medium. However, algal polysaccharides are water-soluble compounds with antibacterial, antiviral, and immune-stimulating activities [40, 41]. Polyunsaturated fatty acids such as omega-6, -7, -9 also exhibited significant antimicrobial activity [42]. Thus, the coexisting of polysaccharides and PUFAs content in *S. platensis* and the antimicrobial compounds from *Lactobacillus* LB might have a synergetic effect that increase the anti-*V. parahaemolyticus* activity of the (*L. acidophilus* LB + *S. platensis*) culture.

Using an *S. platensis*-enriched medium for *L. acidophilus* LB growth increased organic material utilization from 22 g/L to 30 g/L compared to the MRS medium. This modification enhanced bacterial survival, anti-pathogen activity, and provided essential nutrients, such as polyunsaturated fatty acids from the algae biomass, retained in the final product. Despite higher raw material use, this adjustment is a beneficial trade-off for producing more valuable feed supplements. Indeed, the majority of fatty acids in the MRS culture were saturated, including decanoic (C10:0), hexadecanoic (C16:0), and eicosanoic (C20:0) acids, making up $97.48 \pm 0.34\%$ of the total fatty acids content. The findings align with prior research, demonstrating that the predominant fatty acid components present in *Lactobacillus* strains consist of the standard C14, C16, and C18 saturated fatty acids [43, 44]. The branched C₁₄, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, and C₂₁ acids were detected at concentrations of less than 0.5% of the total fatty acid content in most *Lactobacillus* strains [43]. However, the gas chromatography analysis showed that culturing *L. acidophilus* LB in *S. platensis*-containing medium significantly increased PUFAs content compared to MRS culture and algae biomass without fermentation. A higher amount of linoleic acid (omega-6) and palmoleic acid (omega-7) was measured in the bacteria/algae fermented sample. Previous research has suggested that the pathway of fatty acids desaturation can be activated in stressful conditions to protect bacterial cells from damage [45]. During a long fermentation process of 4 days, the stationary phase of *L. acidophilus* LB might induce the biosynthesis of linoleic acid (18:2n-6) as reported in *Escherichia coli* [46], which provides bacteria with survival advantages. Lactic acid bacteria can utilize an oxygen-consuming desaturase system to raise the levels of unsaturated fatty acids. In aquaculture, supplementing diets with PUFAs can improve larvae survival rates, reduce the transition period, and increase disease resistance [47]. Omega-6, a notable PUFAs, offers several

health benefits for both humans and aquatic animals. The addition of 2.4 g of omega-6 per kg of diet has been shown to enhance the growth and immune response of *P. vannamei* against the *Enterocytozoon hepatopenaei* pathogen [48]. Additionally, Dai et al. observed improved hepatopancreatic development in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) fed a diet supplemented with omega-6 [49]. Omega-7 has been noted to improve digestive health and reduce inflammation [50]. Therefore, increasing these PUFAs levels in the fermentation mixture of *L. acidophilus* LB and *S. platensis* may offer various advantages in aquaculture.

Conclusion

The fermentation of *L. acidophilus* LB in *S. platensis*—containing medium significantly enhanced survival rate, anti-*V. parahaemolyticus* pathogen activity of the bacteria. Lactic acid produced by LB strain reached a maximum value of 18.24 ± 2.43 mg/mL in (*S. platensis* + glucose) culture. Moreover, at the inclusion level of 3% w/v, *S. platensis* was able to protect *L. acidophilus* LB against extreme environmental conditions such as high salt concentration of 4%, exposure to heat at 50 °C, and acidic pH of 1–2. It also increases the antibacterial activity of *L. acidophilus* LB against the *V. parahaemolyticus* pathogen to $99.82 \pm 0.24\%$. Moreover, the fermentation of *L. acidophilus* LB significantly increased the content of polyunsaturated fatty acids like omega-6 and -7 which are essential compounds for the growth of aquatic animals. These findings provide solid evidence for further investigation of the positive effect of applying this fermented bioproduct in aquaculture.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03865-9>.

Acknowledgements The results presented in the paper were obtained from the Grassroots-level Projects at the Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology. The authors are grateful for the facilities and resources offered by the institute in completing this research project successfully.

Author Contributions Minh T. Nguyen and Hoai Thu T. Ngo: Investigation; Visualization; Writing original draft; Linh Hang To, Phuong Thu Ha, and Nhat Huy Chu: Writing—review & editing; Linh Hang To and Huong Giang Bui: Investigation, Visualization; Phuong Ha Hoang: Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Supervision, Writing—review & editing.

Funding This work was supported by the Grassroots-level Projects at Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology [Grant number CSCL08.02/24–25 to Phuong Ha Hoang]. Minh T. Nguyen was funded by Vingroup JSC and supported by the Master, PhD Scholarship Programme of Vingroup Innovation Foundation (VINIF), Institute of Big Data, code VINIF.2023.TS067.

Availability of Data and Material All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Code Availability Not applicable.

Declarations

Competing interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics Approval Not applicable.

Consent to Participate Not applicable.

Consent for Publication Not applicable.

References

- Szczerbiec D, Piechocka J, Głowacki R, Torzewska A (2022) Organic acids secreted by *Lactobacillus* spp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Molecules* 27(17):5557
- Cheriet S, Lengliz S, Romdhani A et al (2023) Selection and characterization of bacteriocinogenic lactic acid bacteria from the intestine of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and whiting fish (*Merlangius merlangus*): promising strains for aquaculture probiotic and food bio-preservation. *Life* 13(9):1833. <https://doi.org/10.3390/LIFE13091833>
- Broadbent JR, Cai H, Larsen RL et al (2011) Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *J Dairy Sci* 94:4313–4328. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4068>
- Toledo LET, García DM, Cruz EP et al (2019) Fructosyltransferases and invertases: useful enzymes in the food and feed industries. *Enzymes in Food Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00026-8>
- Scott KP, Duncan SH, Flint HJ (2008) Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutr Bull* 33:201–211. <https://doi.org/10.1111/J.1467-3010.2008.00706.X>
- Caminero A, McCarville JL, Zevallos VF et al (2019) *Lactobacilli* degrade wheat amylase trypsin inhibitors to reduce intestinal dysfunction induced by immunogenic wheat proteins. *Gastroenterology* 156:2266–2280. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.02.028>
- Chiu ST, Chu TW, Simangunsong T et al (2021) Probiotic, *Lactobacillus pentosus* BD6 boost the growth and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via oral administration. *Fish Shellfish Immunol* 117:124–135. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2021.07.024>
- Zuo ZH, Shang BJ, Shao YC et al (2019) Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 86:160–168. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.11.003>
- Ficoseco CA, Mansilla FI, Vignolo GM, Nader-Macías MEF (2023) Optimization of probiotic *Lactobacilli* production for in-feed supplementation to feedlot cattle. *Appl Microbiol* 3:339–357. <https://doi.org/10.3390/APPLMICROBIOL3020024>
- Manzoor A, Qazi JI, Haq IU et al (2017) Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *J Biol Eng* 11:1–10. <https://doi.org/10.1186/S13036-017-0059-2/TABLES/8>
- Nochebuena-Pelcastre X, Álvarez-Contreras AK, Hernández-Robles MF et al (2023) Development of a low pollution medium for the cultivation of lactic acid bacteria. *Heliyon* 9:e22609. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E22609>

12. Yeo S, Shin HS, Lee HW et al (2018) Determination of optimized growth medium and cryoprotective additives to enhance the growth and survival of *Lactobacillus salivarius*. *J Microbiol Biotechnol* 28:718–731. <https://doi.org/10.4014/JMB.1801.01059>
13. Choi GH, Lee NK, Paik HD (2021) Optimization of medium composition for biomass production of *Lactobacillus plantarum* 200655 using response surface methodology. *J Microbiol Biotechnol* 31:717–725. <https://doi.org/10.4014/JMB.2103.03018>
14. Walter J (2008) Ecological role of *Lactobacilli* in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 74:4985. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08>
15. Ma J, Xu C, Liu F et al (2021) Stress adaptation and cross-protection of *Lactobacillus plantarum* KLDS. *CyTA - Journal of Food* 19(1):72–80. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1859619>
16. Wilck N, Matus MG, Kearney SM et al (2017) Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature* 551:585. <https://doi.org/10.1038/NATURE24628>
17. Wells ML, Potin P, Craigie JS et al (2016) Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J Appl Phycol* 29:949–982. <https://doi.org/10.1007/S10811-016-0974-5>
18. Ponnampalam EN, Sinclair AJ, Holman BWB (2021) The sources, synthesis and biological actions of omega-3 and omega-6 fatty acids in red meat: an overview. *Foods* 10:1358. <https://doi.org/10.3390/FOODS10061358>
19. Gotteland M, Riveros K, Gasaly N et al (2020) The pros and cons of using algal polysaccharides as prebiotics. *Front Nutr* 7:163. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2020.00163/BIBTEX>
20. Sylwia Ś, Elżbieta K (2020) Algae *Chlorella vulgaris* as a factor conditioning the survival of *Lactobacillus* spp. in adverse environmental conditions. *LWT* 133:109936. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109936>
21. Pham TLA, Le QK, Nguyen TT et al (2020) Optimizing conditions for *Vibrio parahaemolyticus* culture and preservation. *IFMBE Proc* 69:681–684. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5859-3_115/COVER
22. Guillard RR, Ryther JH (2011) Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella* Nana Hustedt, and *Detonula Confervacea* (Cleve) Gran. 8:229–239. <https://doi.org/10.1139/M62-029>
23. Ogawa T, Terui G (1970) Studies on the growth of *Spirulina platensis*. (I) On the pure culture of *Spirulina platensis*. *J Ferment Technol*. 48:361–367
24. Haghshenas B, Abdullah N, Nami Y et al (2015) Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-*psyllium-fenugreek* polymeric blends. *J Appl Microbiol* 118:1048–1057. <https://doi.org/10.1111/JAM.12762>
25. Arena MP, Silvain A, Normanno G et al (2016) Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a Bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Front Microbiol* 7:464. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00464>
26. Colantoni E, Palone F, Cesi V et al (2022) Innovative method to grow the probiotic *Lactobacillus reuteri* in the omega3-rich microalga *Isochrysis galbana*. *Sci Reports* 12:1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07227-y>
27. Anvar AA, Nowruzi B (2021) Bioactive properties of *Spirulina*: a review. *Microb Bioact*. 4:134–142
28. Niccolai A, Shannon E, Abu-Ghannam N et al (2019) Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis* (*spirulina*) biomass for probiotic-based products. *J Appl Phycol* 31:1077–1083. <https://doi.org/10.1007/S10811-018-1602-3/FIGURES/2>
29. Kumar G, Sivagurunathan P, Thi NBD et al (2016) Evaluation of different pretreatments on organic matter solubilization and hydrogen fermentation of mixed microalgae consortia. *Int J Hydrogen Energy* 41:21628–21640. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2016.05.195>
30. Passos F, Ferrer I (2015) Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Res* 68:364–373. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.10.015>
31. Hossain MS, Balakrishnan V, Rahman NNNA et al (2012) Treatment of clinical solid waste using a steam autoclave as a possible alternative technology to incineration. *Int J Environ Res Public Heal* 9:855–867. <https://doi.org/10.3390/IJERPH9030855>
32. Fu CC, Hung TC, Chen JY et al (2010) Hydrolysis of microalgal cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresour Technol* 101:8750–8754. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.100>
33. Lu Y, Levine RB, Savage PE (2015) Fatty acids for nutraceuticals and biofuels from hydrothermal carbonization of microalgae. *Ind Eng Chem Res* 54:4066–4071. https://doi.org/10.1021/IE503448U/ASSET/IMAGES/LARGE/IE-2014-03448U_0005.JPEG
34. Papizadeh M, Rohani M, Hosseini SN et al (2020) Screening for efficient nitrogen sources for overproduction of the biomass of the functionally probiotic *L. plantarum* strain RPR42 in a cane molasses-based medium. *AMB Express* 10:1–14. <https://doi.org/10.1186/S13568-020-00976-X/TABLES/4>
35. Edward VA, Huch M, Dortu C et al (2011) Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. *Food Control* 22:389–395. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.09.008>
36. Rezvani F, Ardestani F, Najafpour G (2017) Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian J Microbiol* 48:251–258. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2016.12.007>
37. Zamfir M, Grosu-Tudor S (2009) Impact of stress conditions on the growth of *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 and production of acidophilin 801. *J Gen Appl Microbiol* 55:277–282. <https://doi.org/10.2323/JGAM.55.277>
38. de Souza VC, Wan AHL (2021) *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *J Invertebr Pathol* 181:107527. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2020.107527>
39. Figueroa-González I, Hernández-Sánchez H, Rodríguez-Serrano G et al (2010) Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain *Shirot* co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Rev Mex Ing química* 9:11–16
40. Berri M, Collen PN (2016) Green algal sulfated polysaccharides: a natural alternative to antibiotics via modulation of the intestinal immune response. International symposium on alternatives to antibiotics (ATA), Paris, France
41. Chaisuwan W, Phimolsiripol Y, Chaiyaso T et al (2021) The antiviral activity of bacterial, fungal, and algal polysaccharides as bioactive ingredients: potential uses for enhancing immune systems and preventing viruses. *Front Nutr* 8:902. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.772033/BIBTEX>
42. Huang CB, George B, Ebersole JL (2010) Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 55:555. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2010.05.009>
43. Veerkamp JH (1971) Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J Bacteriol* 108:861. <https://doi.org/10.1128/JB.108.2.861-867.1971>
44. Johnsson T, Nikkila P, Toivonen L et al (1995) Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium. *Appl Environ Microbiol* 61:4497–4499. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.12.4497-4499.1995>
45. Guerzoni ME, Lanciotti R, Coconcelli PS (2001) Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology* 147:2255–2264. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2255>

46. DiRusso CC, Black PN, Weimar JD (1999) Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog Lipid Res* 38:129–197. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00022-8)
47. Camacho F, Macedo A, Malcata F (2019) Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: a short review. *Mar Drugs* 17(6):312. <https://doi.org/10.3390/MD17060312>
48. Ning M, Bi J, Sun W et al (2021) Linolenic acid improves growth performance and immune status of *Penaeus vannamei* infected by *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Aquaculture* 535:736397. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736397>
49. Dai YJ, Jiang GZ, Bin LW et al (2022) Evaluation of dietary linoleic acid on growth as well as hepatopancreatic index, lipid accumulation oxidative stress and inflammation in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*). *Aquac Rep* 22:100983. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2021.100983>
50. de Souza CO, Valenzuela CA, Baker EJ et al (2018) Palmitoleic acid has stronger anti-inflammatory potential in human endothelial cells compared to oleic and palmitic acids. *Mol Nutr Food Res* 62(20):e1800322. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201800322>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Authors and Affiliations

Phuong Ha Hoang^{1,3}  · Minh T. Nguyen^{1,3} · Hoai Thu T. Ngo¹ · Nhat Huy Chu^{1,3} · Phuong Thu Ha^{2,3} ·
Huong Giang Bui^{1,3} · Linh Hang To⁴

✉ Phuong Ha Hoang
hph@ibt.ac.vn

¹ Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi 100000, Vietnam

² Institute of Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi 100000, Vietnam

³ Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi 100000, Vietnam

⁴ University of Adelaide, (Adelaide) 230 North Tce, Adelaide, SA 5005, Australia