

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thu Hà

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA
QUANG HỢP BẢN ĐỊA ỨNG DỤNG LÀM PROBIOTIC TRONG
NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*)**

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



Trần Thu Hà


**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA
QUANG HỢP BẢN ĐỊA ỨNG DỤNG LÀM PROBIOTIC TRONG
NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*)**


LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. TS. Hoàng Thị Yên 

2. TS. Đinh Thị Thu Hằng 

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài “Nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp bản địa ứng dụng làm probiotic trong nuôi tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*)” là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

Học viên



Trần Thu Hà

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn và sự kính trọng sâu sắc nhất tới TS. Hoàng Thị Yến, phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học và TS. Đinh Thị Thu Hằng, trưởng Phòng Đào tạo Học Viện Khoa Học và Công nghệ - Viện Hàn lâm khoa học & Công nghệ Việt Nam là những người thầy đã trực tiếp chỉ dạy, hướng dẫn cũng như góp ý tận tình và tạo mọi điều kiện tốt nhất giúp tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và thực hiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới KS. Phạm Thanh Trang và các anh chị trong phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực luận văn.

Tôi cũng xin được cảm ơn tới đề tài "*Nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học từ các chủng vi khuẩn tía quang hợp bản địa để cải thiện chất lượng nước, bổ sung dinh dưỡng và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng (Penaeus vannamei)*" thuộc Đề tài nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp Quốc gia do Bộ Khoa học và Công nghệ chủ trì. Sự hỗ trợ về điều kiện nghiên cứu và kinh phí từ Đề tài này đã đóng góp quan trọng trong quá trình hoàn thiện luận văn của tôi.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học đã tạo mọi điều kiện hỗ trợ tôi được nghiên cứu và học tập tại Viện trong những năm qua.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Ban Giám đốc, các thầy, cô giáo thuộc Khoa Công nghệ sinh học và Phòng Đào tạo, Học viện Khoa Học và Công nghệ đã tận tình giảng dạy, chia sẻ kiến thức và hỗ trợ tôi trong quá trình học tập tại Học viện.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn tới những người thân và bạn bè đã ở bên cạnh, khích lệ và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và làm luận án tốt nghiệp.

Hà Nội, ngày 15 tháng 11 năm 2024

Học viên



Trần Thu Hà

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC CÁC BẢNG	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. GIỚI THIỆU CHẾ PHẨM SINH HỌC PROBIOTIC	3
1.1.1. Giới thiệu về probiotic	3
1.1.2. Cơ chế hoạt động của chế phẩm sinh học probiotic.....	3
1.1.3. Một số tiêu chí lựa chọn các chủng vi sinh vật làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản	5
1.1.4. Thành phần probiotic	6
1.2. TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP	7
1.2.1. Giới thiệu vi khuẩn tía quang hợp.....	7
1.2.2. Sinh thái học của vi khuẩn tía quang hợp	8
1.2.3. Ứng dụng vi khuẩn tía quang hợp trong nuôi trồng thủy sản trên thế giới và ở Việt Nam	9
1.2.3.1. Trên thế giới	9
1.2.3.2. Ở Việt Nam	14
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	16
2.1.1. Nguyên vật liệu	16
2.1.2. Thành phần môi trường nuôi cấy	16
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.2.1. Nhóm phương pháp phân lập vi khuẩn tía quang hợp	17
2.2.1.1. Làm giàu vi khuẩn tía quang hợp.....	17
2.2.1.2. Phân lập vi khuẩn tía quang hợp	17
2.2.1.3. Xác định hình dạng, kích thước tế bào và phương thức sinh sản của vi khuẩn tía quang hợp	18

2.2.2. Nhóm phương pháp sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có hoạt tính probiotic	18
2.2.2.1. Đánh giá khả năng chịu NaCl của các chủng vi khuẩn tía quang hợp phân lập từ nước ngọt	18
2.2.2.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng của vi khuẩn tía quang hợp	18
2.2.2.3. Sàng lọc vi khuẩn tía quang hợp có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp	18
2.2.2.4. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng sinh enzyme tiêu hóa	19
2.2.2.5. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng chịu acid và muối mật.....	20
2.2.2.6. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng tự kết dính	21
2.2.2.7. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng tạo màng biofilm	21
2.2.2.8. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp sinh tổng hợp lipid và PUFA cao	22
2.2.3. Nhóm phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn	23
2.2.3.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào	23
2.2.3.2. Nghiên cứu đặc điểm sắc tố quang hợp	23
2.2.3.3. Nghiên cứu đặc điểm dinh dưỡng carbon, nitrogen.....	23
2.2.3.4. Xác định ảnh hưởng của NaCl đến khả năng sinh trưởng	23
2.2.3.5. Xác định ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng.....	23
2.2.3.6. Xác định khả năng sử dụng sulfide cho sinh trưởng.....	24
2.2.4. Định danh các chủng vi khuẩn tía quang hợp	24
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu.....	25
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	27
3.1. PHÂN LẬP VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP TRONG AO NUÔI TÔM THỂ CHÂN TRẮNG Ở 3 MIỀN BẮC, TRUNG, NAM CỦA VIỆT NAM	27
3.1.1. Làm giàu vi khuẩn tía quang hợp.....	27
3.1.2. Phân lập, làm sạch vi khuẩn tía quang hợp.....	27
3.1.3. Một số đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tía quang hợp	28
3.2. SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP CÓ HOẠT TÍNH PROBIOTIC.....	30
3.2.1. Khả năng chịu muối của các chủng vi khuẩn tía quang hợp phân lập từ các nguồn nước ngọt.....	30
3.2.2. Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn tía quang hợp	31

3.2.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp và sinh enzyme tiêu hoá thức ăn	32
3.2.3.1. Tiền sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp.....	32
3.2.3.2. Tiền sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng sinh enzyme tiêu hoá thức ăn	34
3.2.3.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp vừa có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp và vừa sinh enzyme tiêu hóa	35
3.2.4. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng sinh trưởng ở pH thấp và chịu muối mật	39
3.2.4.1. Khả năng sinh trưởng ở pH thấp của các chủng vi khuẩn tía quang hợp	39
3.2.4.2. Khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn tía quang hợp.....	40
3.2.5. Khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn tía quang hợp.....	41
3.2.5.1. Khả năng tự kết dính của các chủng vi khuẩn tía quang hợp	41
3.2.5.2. Khả năng tạo màng biofilm của các chủng vi khuẩn tía quang hợp	42
3.3. SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP CÓ THÀNH PHẦN DINH DƯỠNG CAO (LIPID VÀ PUFA).....	43
3.3.1. Khả năng tổng hợp lipid của các chủng vi khuẩn tía quang hợp	43
3.3.2. Khả năng tổng hợp PUFA của các chủng vi khuẩn tía quang hợp	44
3.4. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CƠ BẢN VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP TUYỂN CHỌN	47
3.4.1. Đặc điểm sinh học cơ bản của các chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn	47
3.4.1.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào	47
3.4.1.2. Đặc điểm hệ sắc tố quang hợp	48
3.4.1.3. Đặc điểm dinh dưỡng carbon và nitrogen.....	49
3.4.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ muối (NaCl) đến sinh trưởng của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn	50
3.4.1.5. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn	51
3.4.1.6. Khả năng chịu sulfide của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn	52
3.4.2. Xác định trình tự gene 16S rRNA của các chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn	56
3.4.2.1. Giải trình tự gene 16S rRNA	56
3.4.2.2. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp....	57
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	59

1. KẾT LUẬN	59
2. KIẾN NGHỊ.....	59
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	61
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	67
PHỤ LỤC	I
Phụ lục 1: Bảng kết quả xác định khả năng chịu acid (ở pH 2) của các chủng vi khuẩn tía quang hợp nghiên cứu trong dịch dạ dày mô phỏng trong 180 phút	II
Phụ lục 2: Bảng kết quả khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn tía quang hợp nghiên cứu.....	IV
Phụ lục 3: Bảng kết quả xác định khả năng tự kết dính của các chủng vi khuẩn tía quang hợp nghiên cứu	VI
Phụ lục 4: Bảng kết quả xác định khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn tía quang hợp nghiên cứu	VIII
Phụ lục 5: Khả năng tổng hợp lipid của các chủng vi khuẩn tía quang hợp nghiên cứu.....	X
Phụ lục 6: Trình tự trình tự gene 16S rRNA của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn	XII
Phụ lục 7: Một số hình ảnh nghiên cứu.....	XIV

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Giải nghĩa Tiếng Anh	Giải nghĩa Tiếng Việt
AHPND	Acute hepatopancreatic necrosis disease	Bệnh hoại tử gan tụy cấp
Bchl	Bacteriochlorophyll	
BTH		Bán tổng hợp
CFU	Colony forming unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
COD	Chemical oxygene demand	
FCR	Feed conversion ratio	Hệ số chuyển đổi thức ăn
NTTS		Nuôi trồng thủy sản
MUFA	Monounsaturated fatty acids	Acid béo không bão hoà đơn nối đôi
OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase chain reaction	Chuỗi phản ứng trùng hợp
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	Acid béo không bão hoà đa nối đôi
RNA	Acid ribonucleic	
TLK		Trọng lượng khô
TTCT		Tôm thẻ chân trắng
TFA	Total fatty acid	Tổng acid béo
VK		Vi khuẩn
VKTQH		Vi khuẩn tía quang hợp
Vi sinh vật		Vi sinh vật
GA	Glutamate acetate	
DSMZ	Douth samlung microoganisms zentrum	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên Bảng	Trang
3.1.	Làm giàu VKTQH từ các mẫu bùn, nước và ruột tôm thu tại các ao nuôi TTCT ở 3 miền	26
3.2.	Phân lập VKTQH từ các mẫu bùn, nước và ruột tôm thu tại các ao nuôi TTCT ở 3 miền	27
3.3.	Một số đặc điểm sinh học của các chủng VKTQH phân lập được từ các ao nuôi TTCT ở 3 miền	27
3.4.	Khả năng sinh tổng hợp enzyme của các chủng VKTQH phân lập được từ các ao nuôi TTCT ở 3 miền	33
3.5.	Khả năng đối kháng với hai loài VK kiểm định (<i>V. parahaemolyticus</i> và <i>V. harveyi</i>) và sinh enzyme tiêu hóa của các chủng VKTQH lựa chọn	35
3.6.	Hàm lượng PUFA của các chủng VKTQH tuyển chọn	44
3.7.	Tổng hợp các đặc điểm chính của 15 chủng VKTQH có có hàm lượng PUFA cao	46
3.8.	Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH nghiên cứu trên các nguồn carbon và nitrogen khác nhau	59
3.9.	So sánh một số đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa chính của các chủng VKTQH tuyển chọn với một số loài trong chi <i>Rhodovulum</i> và <i>Rhodobacter</i>	54
3.10.	So sánh một số đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa chính của các chủng VKTQH tuyển chọn với một số loài trong chi <i>Rhodopseudomonas</i> và <i>Rhodobium</i>	55
3.11.	So sánh kết quả giải trình tự gene 16S của 3 chủng VKTQH với một số trình tự gene tương ứng trên ngân hàng dữ liệu cơ sở geneBank bằng công cụ BLAST	56

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình	Tên Hình	Trang
3.1.	Ảnh hưởng của nồng độ muối (NaCl) đến khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH phân lập từ các nguồn nước ngọt	29
3.2.	Khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH nghiên cứu	30
3.3.	Khả năng đối kháng (%) của các chủng VKTQH phân lập từ các ao nuôi TTCT ở 3 miền với VK gây bệnh AHPND <i>V. parahaemolyticus</i> và <i>V. harveyi</i>	31
3.4.	Khả năng sinh trưởng trên môi trường dịch dạ dày mô phỏng (pH = 2) trong 180 phút của các chủng VKTQH nghiên cứu	40
3.5.	Khả năng chịu muối mật của các chủng VKTQH nghiên cứu	41
3.6.	Khả năng tự kết dính của các chủng VKTQH nghiên cứu	42
3.7.	Khả năng tạo biofilm của các chủng VKTQH nghiên cứu	42
3.8.	Khả năng tổng hợp lipid của các chủng VKTQH nghiên cứu	43
3.9.	Hình dạng, kích thước khuẩn lạc và tế bào của chủng ND42	47
3.10.	Hình dạng, kích thước khuẩn lạc và tế bào của chủng ST20	47
3.11.	Hình dạng, kích thước khuẩn lạc và tế bào của chủng BN8	48
3.12.	Phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào của 3 chủng VKTQH	49
3.13.	Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH ND42, ST20, BN8 ở các nồng độ NaCl khác nhau	51
3.14.	Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH ND42, ST20, BN8 ở các nồng độ pH khác nhau	52
3.15.	Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH ND42, ST20, BN8 ở các nồng độ Na ₂ S khác nhau	52
3.16.	Cây phát sinh chủng loại của các chủng VKTQH tuyển chọn với một số loài trên geneBank	57

MỞ ĐẦU

Hiện nay, nuôi tôm là một trong những ngành nuôi trồng thủy sản (NTTS) đóng vai trò quan trọng trong lĩnh vực xuất khẩu và mang lại nhiều giá trị kinh tế cho đất nước. Năm 2023, tổng sản lượng nuôi tôm của cả nước đạt 1,21 triệu tấn (tăng 5,8% so với năm 2022), trong đó sản lượng tôm thẻ chân trắng (TTCT) chiếm phần lớn đạt 858,600 tấn. TTCT là loài tôm chính, đóng vai trò chủ lực trong tổng kim ngạch xuất khẩu tôm của cả nước, ước tính đạt khoảng 3,38 tỷ USD.

Bên cạnh sự phát triển nhanh chóng về sản lượng nuôi trồng thì ngành nuôi tôm cũng đã và đang phải đối mặt với nhiều thách thức và khó khăn như: sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng, ô nhiễm môi trường ao nuôi và dịch bệnh lây lan. Một trong những dịch bệnh nguy hiểm và gây thiệt hại nhiều nhất trong nuôi tôm phải kể đến là bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND). Tác nhân chính gây bệnh AHPND được xác định chủ yếu do các chủng thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) chứa 2 gene độc PirA và PirB gây ra, dẫn tới hiện tượng tôm chết hàng loạt và đột ngột. Tỷ lệ tôm chết có thể lên đến 100%.

Để hạn chế tác động của dịch bệnh trong nuôi tôm thì việc sử dụng các chế phẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn (VK) có ích (probiotic) được đánh giá là một trong những giải pháp thay thế hiệu quả và an toàn. Các chế phẩm probiotic không chỉ giúp kích thích hệ tiêu hóa đường ruột của tôm phát triển mà còn tăng khả năng kiểm soát dịch bệnh, đồng thời có tác dụng xử lý ô nhiễm nguồn nước trong ao nuôi.

Tại một số nước có ngành NTTS quy mô công nghiệp phát triển như: Nhật Bản, Trung Quốc, Ấn Độ, Thái Lan, Mỹ... các chế phẩm sinh học đã và đang được sử dụng phổ biến và đã được khẳng định tính an toàn đối với vật nuôi và con người. Các chế phẩm probiotic không chỉ đóng vai trò quan trọng trong xử lý các chất ô nhiễm mà còn được sử dụng như một tác nhân kiểm soát sinh học để đối kháng với VK gây bệnh làm tăng quần thể vi sinh vật (VSV) có lợi, cạnh tranh vị trí bám với các nhóm VK gây bệnh.

Một số nhóm VSV như: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, vi khuẩn tia quang hợp (VKTQH)...thường được sử dụng trong các chế phẩm probiotic. Các chủng VKTQH được sử dụng làm probiotic trong NTTS bởi một số vai trò như: sử dụng làm nguồn protein đơn bào ; Làm chất kháng khuẩn để đối kháng với VK gây bệnh trên tôm; Xử lý nguồn nước trong ao nuôi tôm (giảm H₂S, kim loại nặng, COD, NH₃, ...). Ngoài ra, các tế bào của VKTQH còn chứa nhiều coenzyme Q,

vitamin nhóm B (B1, B2, B6, B12), nhóm E và các acid pantothenic, acid folic. Các sắc tố này không chỉ làm tăng khả năng sinh trưởng của tôm mà còn giúp tôm có màu sắc đẹp hơn, từ đó tăng giá trị xuất khẩu.

Ở Việt Nam, VKTQH đã được nghiên cứu ứng dụng trong: Xử lý nước thải giàu hữu cơ, nước thải chứa các hợp chất hữu cơ mạch vòng khó phân hủy, nước thải chứa hàm lượng sulfide cao. Sử dụng VKTQH làm thức ăn tươi sống cho ấu trùng động vật biển. Sản xuất các hoạt chất sinh học có giá trị: ubiquinone và 5-aminolevulinic acid. Sản xuất thực phẩm chức năng giàu acid béo không no (omega 6,7,9). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào sử dụng VKTQH tạo chế phẩm probiotic sử dụng trong nuôi TTCT. Vì những lý do trên, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài ***“Nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi khuẩn tia quang hợp bản địa ứng dụng làm probiotic trong nuôi tôm thẻ chân trắng (Penaeus vannamei)”***.

Mục tiêu của đề tài:

Có được bộ chủng giống VKTQH bản địa có các đặc tính probiotic ứng dụng làm chế phẩm sinh học trong nuôi TTCT.

Nội dung nghiên cứu:

- Phân lập VKTQH trong ao nuôi TTCT ở 3 miền: Miền Bắc (Hải Phòng, Nam Định), miền Trung (Nha Trang, Phú Yên), miền Nam (Bạc Liêu, Sóc Trăng).
- Sàng lọc các chủng VKTQH có đặc tính probiotic bao gồm các đặc điểm: đối kháng với vi khuẩn gây bệnh AHPND, sinh enzyme tiêu hoá thức ăn, chịu pH thấp và muối mật, có khả năng tự kết dính và tạo màng biofilm.
- Sàng lọc các chủng VKTQH chứa thành phần dinh dưỡng cao (lipid và PUFA).
- Nghiên cứu đặc điểm sinh học cơ bản và định danh các chủng VKTQH lựa chọn

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU CHẾ PHẨM SINH HỌC PROBIOTIC

1.1.1. Giới thiệu về probiotic

Thuật ngữ "probiotic" được sử dụng lần đầu với mục đích để chỉ các chất sinh ra từ VSV, có khả năng hỗ trợ sự phát triển của các VSV khác [1]. Năm 2001, FAO/WHO đã đưa ra khái niệm probiotic là tập hợp các VSV sống, đem lại lợi ích cho sự phát triển của vật chủ nếu được sử dụng với một lượng phù hợp [2]. Tuy nhiên, trong lĩnh vực thủy sản, khái niệm probiotic đã được mở rộng hơn, theo Lazado và Caipang (2014), probiotic được định nghĩa là các VSV dù sống hay chết, hoặc chỉ một phần của VSV hoạt động theo các cơ chế khác nhau giúp đem lại lợi ích cho sự phát triển của vật chủ và môi trường sống của nó [1]. Tóm lại, dựa vào các định nghĩa đa dạng về probiotic cho thấy probiotic không chỉ đơn thuần là chất kích thích sinh trưởng, mà còn là yếu tố quan trọng trong việc duy trì khả năng sống của vật chủ, kiểm soát dịch bệnh và giảm ô nhiễm nước ao nuôi trong NTTS [3].

Các VSV được sử dụng làm probiotic không chỉ hỗ trợ quá trình tiêu hóa mà còn tăng khả năng miễn dịch của vật chủ, giúp phòng trị các dịch bệnh trong NTTS. Bên cạnh đó, việc sử dụng probiotic còn có khả năng làm giảm các chất gây ô nhiễm môi trường nước bởi các chủng VSV trong probiotic có khả năng xử lý các chất độc hại như H_2S , kim loại nặng, COD, NH_3 ,...[1].

1.1.2. Cơ chế hoạt động của chế phẩm sinh học probiotic

Theo Balcazar (2006) có 5 cơ chế hoạt động chính của probiotic trong NTTS [3].

Cạnh tranh loại trừ (Competitive Exclusion)

Các nhóm VSV có hại trước khi gây bệnh cho vật nuôi cần phải có khả năng bám dính vào niêm mạc ruột của vật chủ. Vì vậy cạnh tranh loại trừ hay còn gọi là cạnh tranh bám dính là một trong những đặc điểm đấu tranh sinh tồn của VSV, cũng là một trong những cơ chế hoạt động quan trọng của probiotic. Cạnh tranh loại trừ được thể hiện qua 3 hình thức [3]:

- Cạnh tranh vị trí bám dính: Để ngăn các VK gây bệnh bám dính và xâm nhập vào hệ thống tiêu hóa của vật chủ, các chủng VSV trong probiotic bám dính vào các thụ thể thượng bì mô ruột của vật chủ.
- Cạnh tranh chất dinh dưỡng: Các chất dinh dưỡng có sẵn trong môi trường được các chủng VSV probiotic sử dụng để sinh trưởng, giúp làm giảm hàm lượng chất dinh dưỡng dành cho VK gây bệnh, ức chế sự sinh trưởng và phát triển của VK gây bệnh.

- Tạo môi trường bất lợi: Đê hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của VK gây bệnh, một số chủng probiotic có khả năng sản xuất các chất kháng khuẩn, acid,... tạo môi trường sống bất lợi cho VK gây bệnh (ví dụ làm giảm pH) [1].

Cung cấp nguồn dinh dưỡng và sinh tổng hợp enzyme tiêu hóa

Các chủng VSV probiotic có khả năng cung cấp các vitamin, acid béo, acid amin thiết yếu hoặc các chất dinh dưỡng khác mà vật chủ không thể tự tổng hợp hoặc hấp thụ được từ thức ăn. Bên cạnh đó, các chủng VK probiotic có khả năng sản xuất các enzyme ngoại bào như protease, lipase, amylase,... cung cấp thêm các nguyên tố đa, vi lượng giúp vật nuôi cải thiện quá trình tiêu hóa và tăng trưởng tốt hơn [4, 5].

Sản xuất các chất ức chế

Một số VSV probiotic có khả năng sản sinh các chất ức chế như: bacteriocin, hydro peroxide, siderophore, lysozyme, protease... Các chất ức chế này tạo một hàng rào ngăn cản sự sinh trưởng của các VK gây bệnh [6]. Ngoài ra, một số VK sản sinh acid hữu cơ và acid béo dễ bay hơi (lactic acid, acetic acid, butyric acid và propionic acid) có thể dẫn đến giảm pH trong hệ tiêu hóa của vật nuôi, gây ức chế sinh trưởng của các VSV gây bệnh [3].

Cải thiện chất lượng nước

Trong hệ thống NTTS, chất lượng nước đóng vai trò quan trọng đối với sức khỏe của vật nuôi. Một số chủng VSV probiotic có khả năng hấp thụ hoặc chuyển hóa các chất gây ô nhiễm như NH_4 , NO_2 và các kim loại nặng,... giúp giảm thiểu sự tích tụ các chất độc hại trong ao nuôi. Ngoài ra, các chủng VSV probiotic có khả năng phân hủy các chất hữu cơ như thức ăn dư thừa và các chất thải thành các chất vô cơ đơn giản hơn như CO_2 và nước giúp giảm thiểu sự tích tụ các chất hữu cơ trong ao nuôi [4].

Tác dụng kháng virus

Một số chủng probiotic có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của virus gây bệnh trong NTTS. Mặc dù cơ chế kháng virus chưa được làm rõ, nhưng nhiều nghiên cứu cho thấy các chủng VK có thể bất hoạt virus nhờ các chất hóa học và sinh học, như chiết xuất tảo hay các tác nhân ngoại bào của VK [4]. Nhiều chủng VK đã được chứng minh có hoạt tính kháng virus như: Các chủng *Pseudomonas*, *Vibrios*, *Aeromonas* phân lập từ trại cá hồi giúp giảm hơn 50% mảng bám của virus IHNV; VK *Vibrio* phân lập từ trại tôm sú giúp giảm 62-99% mảng bám của virus

IHNV và OMV [4]. Những kết quả nghiêm cứu này đã mở ra tiềm năng ứng dụng probiotic giúp kiểm soát virus trong NTTS.

1.1.3. Một số tiêu chí lựa chọn các chủng vi sinh vật làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản

Việc lựa chọn các chủng VSV sử dụng làm probiotic rất quan trọng bởi chúng ảnh hưởng trực tiếp tới vật chủ. Mục tiêu chính của việc lựa chọn các chủng VK làm probiotic trước tiên chúng phải an toàn và mang lại những lợi ích cho vật nuôi. Đối với mỗi đối tượng vật chủ các chủng probiotic sẽ đặc trưng và mang lại lợi ích khác nhau. Do vậy, tiêu chí lựa chọn chủng làm probiotic cho mỗi đối tượng vật nuôi cũng khác nhau. Michael (2014) và Balcazar (2006) đã đưa ra một số tiêu chí chung khi lựa chọn các chủng VSV làm probiotic trong NTTS [4, 7].

- *Nguồn gốc*: Các chủng probiotic lý tưởng nhất khi chúng được phân lập từ chính vật chủ mà các chủng sẽ được sử dụng hoặc môi trường sống tự nhiên của vật chủ đó. Đây là nguồn VSV bản địa, đảm bảo khả năng thích nghi và tồn tại của các chủng probiotic trong hệ tiêu hóa của vật chủ.
- *An toàn*: Các chủng probiotic được tuyển chọn phải đảm bảo không gây bệnh, không gây hại cho vật chủ và không mang các gene kháng kháng sinh có thể truyền sang các VK khác.
- *Khả năng sống sót*: Các chủng probiotic phải có khả năng sống sót trong hệ tiêu hóa của vật chủ, bao gồm khả năng chịu được pH thấp trong môi trường acid dạ dày, chịu được nồng độ muối mật trong ruột non và các enzyme tiêu hóa. Vì hoạt động chính của các chủng probiotic diễn ra trong đường ruột, nên khả năng chịu pH thấp và muối mật là yếu tố cần thiết để đảm bảo các chủng VK không bị tiêu diệt trước khi đến đích, giúp duy trì và đảm bảo chức năng của probiotic.
- *Khả năng tồn tại và bám dính*: Khả năng bám dính vào niêm mạc ruột cho phép các chủng VK probiotic có thể tồn tại trong hệ tiêu hóa vật nuôi mà không bị cuốn ra ngoài cùng thức ăn và chất thải khác. Bên cạnh đó, khả năng bám dính của các chủng probiotic giúp tạo ra một lớp màng bảo vệ, cạnh tranh và ngăn chặn sự xâm nhập, phát triển của VK gây bệnh.
- *Tác động có lợi*: Các chủng probiotic tuyển chọn phải đem lại tác động có lợi cho vật chủ, như tăng cường dinh dưỡng, sinh tổng hợp enzyme kích thích tiêu hóa, có khả năng ức chế VK gây bệnh để tăng hệ miễn dịch và phòng trị dịch bệnh.

Bên cạnh đó, Liên Hợp Quốc đã đưa ra một số khuyến nghị về việc lựa chọn phê duyệt sản phẩm probiotic. Một số tiêu chí quan trọng bao gồm [8].

- **Khả năng tồn tại trong đường tiêu hóa của vật chủ:** Probiotic phải có khả năng sinh trưởng được môi trường (acid thấp và muối mật) trong hệ tiêu hóa để đến được ruột và phát huy tác dụng.
- **Khả năng thích nghi và sinh trưởng:** Probiotic cần sinh trưởng và phát triển tốt trong đường ruột của vật nuôi.
- **Khả năng cạnh tranh:** Probiotic cần cạnh tranh với vi khuẩn gây bệnh để giành vị trí bám dính trên niêm mạc ruột, ngăn chặn sự xâm nhập của mầm bệnh.
- **Hiệu quả ức chế mầm bệnh:** Cần có các nghiên cứu in vitro chứng minh khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của probiotic.
- **Thông tin rõ ràng trên nhãn:** Nhãn sản phẩm phải cung cấp đầy đủ thông tin về chủng loại probiotic (chi và loài theo danh pháp quốc tế), liều lượng sử dụng và hạn sử dụng.
- **An toàn cho vật nuôi:** Cần có dữ liệu khoa học chứng minh probiotic an toàn cho vật nuôi, đặc biệt là những cá thể có hệ miễn dịch yếu.

Tóm lại, khi lựa chọn các chủng VSV làm probiotic trong NTTS cần ưu tiên đảm bảo tính an toàn, không gây hại cho vật nuôi và môi trường ao nuôi. Bên cạnh đó, các chủng probiotic phải mang lại lợi ích cho sức khỏe vật nuôi. Đồng thời, phải tuân thủ các tiêu chuẩn về probiotic của các tổ chức quốc tế như Liên Hợp Quốc.

1.1.4. Thành phần probiotic

Trong các chế phẩm probiotic thường bao gồm 4 nhóm VSV sau:

- **Nhóm VK Lactic:** Nhóm VK Lactic có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nhiều VK gây bệnh như: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio spp* và *Aeromonas spp* bởi chúng có khả năng sản sinh ra các hợp chất kháng khuẩn như acid và bacteriocin [9]. Các hợp chất này có thể tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của nhiều loài VK gây bệnh mà không gây hại cho vật nuôi và môi trường, góp phần giảm dịch bệnh trong NTTS. Chủng VK Lactic còn có khả năng chuyển hóa carbohydrate tạo ra acid lactic, làm giảm pH đường ruột, tạo môi trường bất lợi để ức chế sự sinh trưởng của VK gây bệnh, đặc biệt là *Vibrio* và *Aeromonas* [10]. Một số loài VK Lactic thường được lựa chọn làm probiotic bao gồm: *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, ... [9].

- **Nhóm VK *Bacillus***: Một số loài VK như: *Bacillus subtilis*; *Bacillus licheniformis*; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus coagulans*,... đã được sử dụng rộng rãi làm probiotic trong NTTS do khả năng sinh các enzyme tiêu hóa amylase, protease và lipase... giúp hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, hấp thụ dinh dưỡng và tăng cường kiểm soát chất lượng nước [11] Nhiều nghiên cứu đã chứng minh việc sử dụng *Bacillus* làm probiotic giúp tăng khả năng chuyển hóa thức ăn, kích thích tăng trưởng vật chủ [11, 12].
- **Nhóm nấm men**: Nấm men có khả năng ức chế sự sinh trưởng của các VK gây bệnh, đồng thời giúp giảm ô nhiễm nước ao nuôi bằng cách sử dụng lượng đường dư thừa trong nước để lên men, tạo ra môi trường cạnh tranh về dinh dưỡng với các loài VK khác. Một số loài thuộc chi *Saccharomyces* như: *Saccharomyces cerevisiae*; *Saccharomyces boulardii* được sử dụng phổ biến làm probiotic trong NTTS [13].
- **Nhóm VKTQH**: VKTQH được sử dụng làm probiotic trong NTTS bởi những vai trò của chúng trong việc giảm ô nhiễm các chất độ hại trong nước (COD, H₂S, kim loại nặng...), cung cấp nguồn protein đơn bào và sử dụng làm probiotic [14], [15], [16].

1.2. TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP

1.2.1. Giới thiệu vi khuẩn tía quang hợp

VKTQH là một nhóm VSV tiền nhân có khả năng quang hợp nhưng không tạo ra oxy [17]. Khi được chiếu sáng, nhiều loài VKTQH có thể sử dụng CO₂ làm nguồn carbon để tổng hợp chất hữu cơ (quang tự dưỡng) hoặc sử dụng các hợp chất hữu cơ sẵn có làm nguồn carbon (quang dị dưỡng) [17], [18] Đặc tính của tất cả các loài thuộc nhóm này là chúng chứa sắc tố quang hợp *Bacteriochlorophyll* (*Bchl*) và khả năng sử dụng các hợp chất như lưu huỳnh, hợp chất khử lưu huỳnh, hydro hoặc các hợp chất hữu cơ đơn giản (acid hữu cơ, đường, rượu) làm nguồn cung cấp electron trong quá trình quang hợp, thay vì sử dụng nước như các đối tượng quang dưỡng khác [17], [19].

Theo Hệ thống phân loại của Bergey (1989), dựa trên khả năng tích lũy lưu huỳnh, VKTQH được chia làm ba họ chính bao gồm [20].

- ***Chromatiaceae***: Là những VK tía lưu huỳnh có khả năng tích lũy nguyên tố lưu huỳnh ở dạng giọt bên trong tế bào.
- ***Ectothiorhodospiraceae***: Là những VK tía lưu huỳnh, tích lũy lưu huỳnh ở dạng giọt bên ngoài tế bào.

- ***Rhodospirillaceae***: Là những VK quang hợp có khả năng sử dụng các hợp chất khử của lưu huỳnh làm nguồn cho điện tử quang hợp nhưng lưu huỳnh được oxy hóa tiếp theo và không tích lũy trong tế bào - VK tía không lưu huỳnh.

Theo Hệ thống phân loại của Bergey (2001), dựa trên mối quan hệ tiến hóa và đặc điểm phân tử, VK quang hợp được chia thành ba nhóm *Proteobacteria* [18].

- **α -*Proteobacteria***: Bao gồm VK tía hiếu khí và VK tía không lưu huỳnh.
- **β -*Proteobacteria***: Là VK tía không lưu huỳnh, tuy nhiên khác với nhóm α -*Proteobacteria* về kích thước và trình tự cytochrome c và thành phần quinone, acid béo).
- **γ -*Proteobacteria***: gồm *Chromatiaceae* (tích lũy lưu huỳnh ở trong tế bào) và *Ectothiorhodospiraceae* (tích lũy lưu huỳnh ở ngoài tế bào).

1.2.2. Sinh thái học của vi khuẩn tía quang hợp

VKTQH là loài VSV có quá trình trao đổi chất linh hoạt nên có thể thích nghi và sinh trưởng được ở nhiều loại môi trường khác nhau trong tự nhiên. Chúng thường sống trong các thủy vực thiếu oxy nhưng vẫn có thể thu nhận được đủ ánh sáng để quang hợp, đặc biệt là ở các lớp bùn đáy. Trong tự nhiên, VKTQH được phân bố ở nhiều nơi, từ các vùng đầm nước mặn, nước lợ, ao hồ, đến đất bùn, ruộng lúa. Tuy nhiên, môi trường lý tưởng của nhóm VKTQH là các thủy vực nước ngọt, mặn, lợ, giàu chất hữu cơ và hàm lượng oxy hòa tan thấp [19].

Ao nuôi tôm là một trong những môi trường lý tưởng thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của VKTQH do nguồn dinh dưỡng phong phú từ các hợp chất hữu cơ trong thức ăn dư thừa và chất thải nuôi tôm [21]. Bên cạnh đó, hoạt động của tôm tiêu thụ nhiều oxy, đặc biệt ở đáy ao, tạo điều kiện yếm khí giúp VKTQH sinh trưởng mạnh. Khả năng thích nghi của VKTQH trong môi trường thiếu oxy, kết hợp với các yếu tố thuận lợi như nhiệt độ và pH ổn định trong ao giúp VKTQH trở thành một phần quan trọng trong hệ sinh thái ao nuôi. Hiểu rõ vai trò của VKTQH không chỉ giúp khám phá sự đa dạng sinh học trong ao nuôi mà còn mở ra tiềm năng sử dụng các chủng VSV bản địa này để cải thiện chất lượng nước và nâng cao năng suất nuôi tôm [21].

Hàm lượng sulfate ở các đáy ao NTTS ven biển thường rất cao tạo điều kiện cho VK khử sulfate hoạt động, sản sinh ra sulfide [22]. Sulfide thường tích tụ ở lớp đáy ao hồ và khuếch tán lên trên, tạo điều kiện cho VKTQH sinh trưởng ở những vùng nước có đủ ánh sáng. Cường độ ánh sáng và nồng độ sulfide thay đổi theo độ

sâu, nên các loài VKTQH khác nhau sẽ phân bố ở các tầng nước khác nhau. Khi điều kiện môi trường thuận lợi, VKTQH sinh trưởng với số lượng lớn, gây ra hiện tượng "nở hoa", làm nước ao hồ chuyển sang màu đỏ nâu, tía, hoặc đỏ. Hiện tượng này có thể do một hoặc nhiều loài VKTQH cùng gây ra [23].

VKTQH có khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh trong môi trường nước thải. Nghiên cứu tại Minnesota (Mỹ) đã ghi nhận hiện tượng "nở hoa" của nhóm VK này trong hồ xử lý nước thải từ nhà máy chế biến rau quả. Sự phát triển mạnh mẽ của VKTQH đã làm giảm thiểu ô nhiễm trong hồ. Các loài VKTQH phổ biến được tìm thấy trong hồ này bao gồm *Rba. capsulatus* và *Rba. sphaeroides* [23].

Okubo và cộng sự (2006) đã nghiên cứu thấy sự phát triển mạnh của VKTQH trong các kênh chứa nước thải chăn nuôi. Sự phát triển này hình thành một lớp thảm VK màu đỏ trên bề mặt nước. Một số loài VK được xác định bao gồm *Rps. palustris*, *Rba. capsulatus* và *Rba. sphaeroides* [24].

Trong các hệ thống xử lý bùn công, VKTQH có khả năng sinh trưởng mạnh và tích lũy sinh khối cao với số lượng quần thể của chúng có thể tăng lên gấp 50 lần trong bùn hoạt tính so với bùn thô. Khi bùn được ủ trong điều kiện yếm khí và có ánh sáng, sự xuất hiện của VKTQH sẽ tạo nên màu đỏ nâu đặc trưng [19], [22].

Ngoài ra, VKTQH có thể thích nghi với nhiều môi trường khắc nghiệt, từ suối lưu huỳnh, suối nước nóng, đến các thủy vực có độ pH cao hoặc thấp, vùng biển mặn, thậm chí cả dưới lớp băng dày từ 4 đến 7 mét ở hồ Nam Cực [25]. Sự tồn tại của chúng trong những điều kiện khắc nghiệt như vậy cho thấy khả năng thích nghi mạnh mẽ và sự đa dạng sinh thái của nhóm VKTQH trong tự nhiên [19].

1.2.3. Ứng dụng vi khuẩn tía quang hợp trong nuôi trồng thủy sản trên thế giới và ở Việt Nam

1.2.3.1. Trên thế giới

Sử dụng VKTQH làm protein đơn bào

Shapawi và cộng sự (2012) đã sử dụng VKTQH thuộc chi *Rhodovulum* để bổ sung vào thức ăn thương mại trong nuôi cá chêm (*Lates calcarifer*). Sinh khối tươi chủng VKTQH *Rhodovulum* được trộn với thức ăn thương mại theo các tỷ lệ 0,3%, 0,6% và 0,9% và để khô tự nhiên, thí nghiệm cho ăn kéo dài 12 tuần. Kết quả cho thấy, cá ăn thức ăn có bổ sung 0,3% sinh khối tươi *Rhodovulum* có tốc độ tăng trưởng, tỷ lệ sống và tỷ lệ FCR cao nhất. Cụ thể, hệ số FCR đạt 1,95 và tỷ lệ sống đạt 86,7%. Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng VKTQH để thúc đẩy tăng trưởng, tăng hệ số chuyển đổi thức ăn và nâng cao tỷ lệ sống của cá chêm [26].

Chumpol và cộng sự (2018) đã tuyển chọn được 2 chủng VKTQH tiềm năng (*Rba. sphaeroides* SS15 và *A. marina* STW181) có hàm lượng protein và sắc tố quang hợp cao. Sau khi đông khô VKTQH được trộn với thức ăn thương mại ở các tỷ lệ 1%, 3% và 5%. Tôm được cho ăn 4 lần/ngày trong 60 ngày. Kết quả cho thấy, khi thức ăn bổ sung 1% VKTQH, tôm tăng trưởng tốt nhất và tỷ lệ sống cao nhất (85%). Từ kết quả trên, tác giả đã kết luận sinh khối VKTQH có thể được sử dụng làm nguồn protein bổ sung vào thức ăn cho tôm [27].

Alloul và cộng sự (2021) đã sử dụng VKTQH làm nguồn protein bổ sung vào thức ăn cho tôm. Các chủng VKTQH thuộc loài *Rps. palustris*, *Rba. capsulatus* được ly tâm thu sinh khối, sấy khô. Sau khi sấy khô VKTQH được nghiền thành bột trước khi bổ sung vào thức ăn cho tôm với tỷ lệ 5% và 11% và cho tôm ăn trong 28 ngày. Kết quả cho thấy, việc bổ sung VKTQH vào thức ăn cho tôm làm tăng hiệu suất tăng trưởng của tôm. Cụ thể trọng lượng cá thể tăng từ $320,4 \pm 19,9$ mg đến $404,5 \pm 55,2$ mg. Như vậy, từ nghiên cứu trên cho thấy VKTQH có thể được sử dụng như một nguồn protein bổ sung trong thức ăn cho tôm [28].

Sử dụng VKTQH làm probiotic

Đối kháng với VK gây bệnh

Chumpol và cộng sự (2017) đã phân lập và tuyển chọn được 4 chủng VKTQH: S3W10, SS15, TKW17 và STW181 có khả năng đối kháng với 3 loài VK *Vibrio* gây bệnh cho tôm: *V. harveyi*, *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus*. Trong nghiên cứu này, các chủng VKTQH được nuôi ở điều kiện vi hiếu khí - sáng trong 48 giờ. Sau đó, VKTQH được ly tâm để thu tế bào, rửa sạch và tái huyền phù trong dung dịch nước muối sinh lý và điều chỉnh mật độ tế bào với nồng độ cuối cùng là 10^8 CFU/mL. Kết quả thí nghiệm nuôi TTCT trong 60 ngày cho thấy tỷ lệ sống của tôm không khác biệt đáng kể giữa các nhóm sử dụng VKTQH và nhóm đối chứng. Như vậy VKTQH không ảnh hưởng tiêu cực đến tỷ lệ sống sót của tôm. Tuy nhiên, trong thí nghiệm khi gây cảm nhiễm tôm với *V. parahaemolyticus*, kết quả cho thấy sau 10 ngày tỷ lệ sống của tôm ở nhóm thí nghiệm (có sử dụng VKTQH) đạt 68-80% trong khi nhóm đối chứng (không sử dụng VKTQH) đạt 60%. Như vậy việc sử dụng VKTQH có thể giúp bảo vệ tôm khỏi tác động của VK gây bệnh AHPND [29].

Seangtumnor và cộng sự (2018) đã sử dụng phương pháp khuếch tán phủ lớp thạch (overlay diffusion) để tiến hành tiền sàng lọc VKTQH có khả năng ức chế *Vibrio*. Kết quả cho thấy trong số 22 chủng VKTQH phân lập trong ao nuôi tôm ở

Thái Lan có 12 chủng (chiếm 54,55%) có khả năng đối kháng 3 loài VK *Vibrio* gây bệnh trên tôm: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus*. Từ kết quả nghiên cứu, tác giả đã kết luận hơn 50% số chủng VKTQH phân lập từ ao nuôi tôm có khả năng ức chế 1 trong 2 loài *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND. Trong đó, có một số chủng VKTQH có khả năng ức chế được nhiều loài *Vibrio*. Điều này cho thấy việc lựa chọn nguồn phân lập là một bước quan trọng để sàng lọc chủng VKTQH có tiềm năng đối kháng *Vibrio* gây bệnh AHPND trong ao nuôi tôm [30].

Alloul và cộng sự (2021) đã tiến hành xác định khả năng đối kháng của VKTQH với *Vibrio* (*V. parahaemolyticus* và *V. campbellii*) gây bệnh trên tôm. Các chủng VKTQH được nuôi cấy ở các điều kiện sinh trưởng khác nhau (quang dị dưỡng, quang tự dưỡng và hóa dị dưỡng) và đánh giá khả năng đối kháng của VKTQH dạng tươi sống và VKTQH dạng đông khô với *Vibrio* gây bệnh. Kết quả cho thấy, cả VKTQH dạng sống và sấy khô đều có khả năng ức chế sinh trưởng của *Vibrio*. Trong đó, các loài *Rps. palustris*, *Rba. capsulatus*, *Rsp. rubrum* và *A. marina* có hiệu quả kháng khuẩn tốt đối với cả hai mầm bệnh *V. parahaemolyticus* và *V. campbellii*. Như vậy, kết quả cho thấy, VKTQH có khả năng sản sinh các hợp chất kháng khuẩn dù trong bất kể điều kiện trao đổi chất nào và ở dạng đông khô hay tươi sống [28].

Torpee và cộng sự (2022) đã bổ sung dịch chiết VKTQH *Rba. sphaeroides* SS15 vào thức ăn của TTCT nhằm kiểm soát bệnh AHPND và duy trì chất lượng nước mà không cần sử dụng kháng sinh. Chủng *Rba. sphaeroides* SS15 sau khi ly tâm thu dịch nổi, trộn với ethyl acetate theo tỷ lệ 1:1 và được đông khô, sau đó trộn với thức ăn tôm theo tỷ lệ 0,27% (w/w). Kết quả cho thấy, việc bổ sung dịch chiết VKTQH SS15 vào thức ăn tôm trong 63 ngày liên tiếp có thể làm tăng tỷ lệ sống của tôm bị nhiễm *V. parahaemolyticus* lên 17% thông qua việc cải thiện chất lượng nước và tăng cường khả năng miễn dịch. Bên cạnh đó, mẫu gan tụy và ruột của tôm khi được ăn thức ăn bổ sung VKTQH không có dấu hiệu của bệnh AHPND [31].

Sinh enzyme tiêu hóa thức ăn

Wang và cộng sự (2011) đã nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung probiotic đến tăng trưởng và hoạt động của các enzyme tiêu hóa thức ăn ở cá mè. Thí nghiệm được tiến hành trên 12 nhóm cá mè được chia ngẫu nhiên, trong 60 ngày và cho ăn 3 loại probiotic: *Bacillus coagulans*, *Rps. palustris* và *Lactobacillus acidophilus*. Kết quả cho thấy, cả 3 loại probiotic đều có sự tăng trưởng tốt hơn đáng kể so với nhóm đối chứng và không thấy có sự khác biệt nhiều về sự tăng

trường giữa ba nhóm probiotic. Ngoài ra, hoạt động các enzyme amylase, protease và cellulase được cải thiện đáng kể khi sử dụng probiotic. Nghiên cứu trên đã cho thấy tiềm năng sử dụng VKTQH *Rps. palustris* làm probiotic đạt hiệu quả tương đương với các nhóm VK probiotic khác như *Bacillus* và *Lactobacillus* [32].

Chumpol và cộng sự (2017) đã tiến hành sàng lọc các chủng VKTQH có khả năng sinh enzyme: gelatinase, amylase, lipase. Kết quả đã tuyển chọn được 6 chủng VKTQH sinh enzyme mạnh nhất trong tổng số 185 chủng VKTQH phân lập được. Ngoài ra, cả 6 chủng này đều có khả năng sinh enzyme gelatinase với đường kính vòng phân giải từ 9,93 - 34,33 mm [29].

Seangtumnor và cộng sự (2018), đã tiến hành sàng lọc các chủng VKTQH có khả năng sinh tổng hợp enzyme phân giải protein từ 22 chủng VKTQH phân lập ở các ao nuôi tôm ở Thái Lan. Kết quả cho thấy có 18 chủng (chiếm 81,82%) có khả năng sinh enzyme protease ở cả 2 điều kiện hiếu khí - tối và vi hiếu khí - sáng [30].

Koga và cộng sự (2022) đã sử dụng chủng *Rhv. sulfidophilum* KKMI01 bổ sung vào thức ăn cho tôm trong 145 ngày. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống đạt 67,2% trong khi nhóm đối chứng đạt 58,9% và tỷ lệ FCR của tôm khi sử dụng VKTQH cao hơn khoảng 10% so với nhóm đối chứng. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy khi sử dụng chủng VKTQH *Rhv. sulfidophilum* KKMI01 bổ sung vào thức ăn cho tôm giúp tăng cường điều hòa các gene liên quan đến miễn dịch trên tôm như: *rophenoloxidase*, *peptide* kháng khuẩn và *superoxide dismutase* [33].

Chịu pH thấp và muối mật

Fang và cộng sự (2012) đã tiến hành nghiên cứu tiềm năng probiotic của chủng VKTQH *Rps. palustris* 2C thông qua thí nghiệm đánh giá khả năng sống sót của chủng VK này khi tiếp xúc với môi trường acid (pH thấp) của dạ dày và môi trường muối mật cao của ruột non. Kết quả cho thấy, chủng 2C có khả năng sống sót tốt ở pH 3 và 4, với tỷ lệ sống sót trên 80% sau 180 phút. Tuy nhiên, ở pH 2 tỷ lệ sống sót của chủng 2C giảm đáng kể theo thời gian, chỉ còn 66,38% sau 180 phút. Ngoài ra, khả năng sống sót ở 2 nồng độ muối mật 0,5% và 0,9% trong 240 phút không bị ảnh hưởng và tỷ lệ này lần lượt là 85% và 84% [34].

Zhou và cộng sự (2017) đã nghiên cứu đánh giá tiềm năng sử dụng làm probiotic trong NTTS của 2 chủng VKTQH *Rps. palustris* HZ0301 và *Rba. sphaeroides* HZ0302. Trong điều kiện dịch dạ dày mô phỏng ở pH 2, pH 3, pH 4 và trong ruột non (pH 8, nồng độ muối mật 0,3%). Tương tự như kết quả nghiên cứu của Fang và cộng sự (2012), 2 chủng HZ0301 và HZ0302 đều có khả năng sống sót

trên 80% ở pH 3 và pH 4 trong 180 phút, tuy nhiên ở pH 2 khả năng sót của 2 chủng HZ0301 và HZ0302 giảm lần lượt là 45,80% và 52,77%. Như vậy, pH 2 và pH 3 là giá trị để lựa chọn các chủng VK tiềm năng sử dụng làm probiotic. Ngoài ra, sự có mặt của thức ăn và thành phần có trong thức ăn có khả năng cải thiện tỷ lệ sống sót của các chủng VSV trong dạ dày do khi bổ sung cùng thức ăn sẽ làm tăng giá trị pH của dạ dày [35]. Vì vậy, tác giả khuyến nghị nên bổ sung probiotic cùng với thức ăn để nâng cao tỷ lệ sống sót của chúng. Ngoài ra, khi nuôi 2 chủng HZ0301 và HZ0302 trong môi trường dịch ruột non mô phỏng pH 8 và bổ sung muối mật 0,3% trong 240 phút, kết quả cho thấy tỷ lệ sống sót của 2 chủng HZ0301, HZ0302 lần lượt là 100,83% và 98,23%. Như vậy, cả 2 chủng đều có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường ruột non mô phỏng dù có hoặc không có muối mật [35].

Sử dụng VKTQH để xử lý ô nhiễm nước

Azad và cộng sự (2016) đã tiến hành nghiên cứu khả năng sử dụng VKTQH *A. marina* ME trong việc kiểm soát các chất dinh dưỡng vô cơ hòa tan trong ao nuôi cá rô phi (*Oreochromis niloticus*). Thí nghiệm được thực hiện trong 7 ngày không thay nước, sử dụng 4 công thức bổ sung *A. marina* ME (0,005 g/L; 0,01 g/L; 0,02 g/L và 0,03 g/L) và mẫu đối chứng sử dụng chế phẩm sinh học *Bacillus* thương mại. Kết quả cho thấy, nồng độ NH₄, NO₂, NO₃ và phosphate thấp nhất được quan sát thấy ở cả 2 công thức sử dụng *A. marina* ME và chế phẩm sinh học *Bacillus* thương mại với nồng độ bổ sung 0,03 g/L. Như vậy, khi sử dụng VKTQH để loại bỏ các chất dinh dưỡng vô cơ hòa tan trong hệ thống nước ao nuôi ô nhiễm có hiệu quả tương đương với chế phẩm *Bacillus* [36].

Ô nhiễm môi trường ao nuôi là một trong những vấn đề quan trọng cần được giải quyết trong nuôi tôm. Việc nước nuôi có hàm lượng chất dinh dưỡng cao, đặc biệt là phosphate, dẫn đến hiện tượng phú dưỡng và làm ô nhiễm môi trường ao nuôi, ảnh hưởng hiệu suất nuôi trồng. Bunruk và cộng sự (2017) đã phân lập được 83 chủng VKTQH từ các mẫu nước và trầm tích thu tại các ao nuôi tôm tỉnh Phang-nga và Songkhla của Thái lan. Trong 83 chủng VKTQH đã sàng lọc được 2 chủng VKTQH W12 và W48 có khả năng loại bỏ phosphate trong ao nuôi tôm hơn 50% [37].

Chumpol và cộng sự (2018) đã nghiên cứu đánh giá hiệu quả việc sử dụng hỗn hợp chủng VKTQH trong việc kiểm soát chất lượng nước, tăng cường khả năng ức chế VK *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND và thúc đẩy tăng trưởng của TTCT. Thí nghiệm bổ sung hỗn hợp VKTQH vào nước nuôi tôm mà không thay

nước trong suốt 4 tuần. Kết quả cho thấy, trong các bể nuôi có bổ sung hỗn hợp VKTQH, nồng độ NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- và COD đều thấp hơn đáng kể so với các bể đối chứng (không có VKTQH). Tác giả cho rằng nguyên nhân do VKTQH có khả năng phân hủy các chất thải hữu cơ, từ đó giảm COD và hạn chế sự hình thành NH_4^+ . Đồng thời, VKTQH giúp thúc đẩy quá trình nitrat hóa, chuyển hóa NH_4^+ thành NO_2^- rồi thành NO_3^- , dạng nitơ ít độc hơn cho tôm. Nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng của việc sử dụng VKTQH làm chế phẩm sinh học trong nuôi TTCT [38].

Peng và cộng sự (2021) đã sử dụng hỗn hợp các chủng VKTQH *Rhv. strictum* và *Thiococcus pfennigii* để xử lý nước sông bị ô nhiễm. Kết quả cho thấy nồng độ COD giảm 70,5% sau 120 giờ. Hiệu suất loại bỏ sulfide và NH_4 đạt 91,7% và 28,3% sau 48 giờ, tương ứng. Ngoài ra, nước sông bị ô nhiễm nặng trở nên ít đục hơn nhiều sau khi sử dụng VKTQH [16].

Dong và cộng sự (2021) đã nghiên cứu sử dụng chủng VKTQH *Rba. sphaeroides S1* trong xử lý nước thải NTTS. Kết quả cho thấy, chủng VKTQH này có khả năng loại bỏ 97,50% NH_4 , 93,24% P và 92,50% COD. Kết quả cho thấy tiềm năng ứng dụng VKTQH *Rba. sphaeroides* trong xử lý nước thải NTTS [39].

1.2.3.2. Ở Việt Nam

Trong nghiên cứu sử dụng VKTQH xử lý H_2S trong đáy ao nuôi thủy sản, Võ Thị Hạnh và cộng sự (2004) đã nghiên cứu ứng dụng VKTQH để xử lý H_2S trong ao NTTS và phát triển thành công chế phẩm sinh học VEM dựa trên công nghệ EM của Nhật Bản. Chế phẩm này không chỉ bao gồm các VSV có trong EM gốc mà còn được bổ sung các loài *Bacillus* và VKTQH như *Rhodobacter* và *Rhodococcus* có nguồn gốc từ Trung Quốc [40].

Trong nghiên cứu định hướng ứng dụng VKTQH để xử lý sulfide trong các nguồn nước ô nhiễm, Đỗ Thị Liên (2016) đã tuyển chọn được 3 chủng VKTQH thuộc 2 loài *Rba. sphaeroides* và *Rhv. sulfidophilum* có khả năng loại bỏ sulfide cao. Nghiên cứu này cũng tiến hành thử nghiệm chế phẩm VKTQH trong điều kiện bán tự nhiên và tự nhiên tại ao nuôi cá rô phi. Kết quả cho thấy, chế phẩm VKTQH giúp loại bỏ hoàn toàn H_2S (từ 0,03 - 0,04 mg/L xuống 0 mg/L). Hơn nữa, cá rô phi trong nhóm thí nghiệm sử dụng VKTQH đạt tốc độ tăng trưởng trung bình 513,10 g/con, cao hơn so với nhóm đối chứng 465,10 g/con [41].

Trần Việt Quyền và cộng sự (2022) đã phân lập, tuyển chọn và định danh được 4 chủng VKTQH có khả năng xử lý sulfide trong ao nuôi tôm ở huyện Kiên Lương, tỉnh Kiên Giang. Trong đó, chủng *Rhv. sulfidophilum* KS2 cho thấy khả

năng xử lý sulfide cao nhất, đạt tỷ lệ 45,47% [42].

Trong nghiên cứu định hướng ứng dụng VKTQH làm thức ăn tươi sống cho ấu trùng động vật biển, Hoàng Thị Yên (2010) đã phân lập được 4 chủng VKTQH giàu dinh dưỡng, trong đó acid béo không no một nối đôi (MUFA) chiếm tỷ lệ đáng kể (khoảng 80% TFA) [43]. Tuy nhiên, hạn chế của các chủng này là chưa có khả năng tổng hợp axit béo không no đa nối đôi (PUFA) - một thành phần quan trọng cho sự phát triển của ấu trùng. Sau khi tiếp tục nghiên cứu, nhóm tác giả đã phân lập và tuyển chọn được một số chủng VK có khả năng tổng hợp cả MUFA (omega 7) và PUFA (omega 6,9), mở ra tiềm năng ứng dụng VKTQH trong NTTS [44].

Hoàng Thị Yên và cộng sự (2023) đã nghiên cứu sử dụng chủng VKTQH *Rhv. sulfidophilum* NA2.6 làm thức ăn tươi sống cho hàu giống bởi chủng VK có thành phần dinh dưỡng cao (lipid chiếm 27,59% TLK; hàm lượng MUFAs và PUFA lần lượt là 58,28% và 26,62% TFA). Kết quả cho thấy chủng *Rhv. sulfidophilum* NA2.6 có thể thay thế hoàn toàn vi tảo trong giai đoạn ấu trùng hàu từ mới nở đến 8-10 ngày tuổi. Đặc biệt, việc kết hợp VKTQH này với hai loài vi tảo *Isochrysis galbana* và *Chatoceros calcitrans* theo tỷ lệ 1:1:1 về lượng trong giai đoạn phát triển của ấu trùng làm tăng tỷ lệ sống của hàu lên 15,8% [45].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên vật liệu

Các mẫu được thu tại ao nuôi TTCT thuộc 3 miền Bắc (Hải Phòng, Nam Định), miền Trung (Nha Trang, Phú Yên), miền Nam (Bạc Liêu, Sóc Trăng). Mỗi tỉnh thu mẫu tại 5 ao nuôi tôm, mỗi ao thu 3 mẫu (bùn, nước, tôm), mỗi mẫu được lặp lại 3 lần. Tổng số lượng mẫu phân lập 270 mẫu gồm: 90 mẫu bùn, 90 mẫu nước và 90 mẫu ruột tôm.

261 chủng VKTQH từ bộ sưu tập chủng giống hiện đang được lưu giữ tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học bao gồm: 125 chủng phân lập tại các nguồn nước lợ và mặn (Thanh Hóa, Nghệ An, Vũng Tàu) và 136 chủng phân lập tại một số nguồn nước ngọt (Thái Bình, Hà Nội, Bắc Ninh).

Chủng VK kiểm định *V. parahaemolyticus* BLV10 chứa 02 gene độc PirA, PirB được phân lập từ tôm bị bệnh AHPND tại xã Vĩnh Bình, huyện Hòa Bình, tỉnh Bạc Liêu, được lưu giữ trong bộ sưu tập chủng giống của phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen .

Chủng chuẩn *V. harveyi* nhận được từ Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.1.2. Thành phần môi trường nuôi cấy

Môi trường phân lập và làm sạch VKTQH là môi trường DSMZ-27 [46] có cải tiến bao gồm: succinate-Na (1 g/L); cao nấm men (0,3 g/L); acetate (0,5 g/L); NH₄Cl (0,4 g/L); citrate-Fe (1%) ; KH₂PO₄ (0,5 g/L); CaCl₂.2H₂O (0,05 g/L); MgSO₄.7H₂O (0,4 g/L); NaCl (15g/L); vi lượng SL6^(*) 1 mL; dung dịch vitamin B12 (0,4 mL); pH 7.

Môi trường nuôi cấy VKTQH là môi trường GA [47] có cải tiến bao gồm: cao nấm men (2 g/L); acetate (5,44 g/L); K₂HPO₄ (0,5 g/L); (NH₄)₂HPO₄ (0,8 g/L); KH₂PO₄ (0,5 g/L); MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L); CaCl₂.2H₂O (0,053 g/L); dung dịch vitamin B₁₂^(**)(0,4 mL/L); vi lượng SL6^(*) (1 mL/L); glutamate (3,8 g/L); NaCl (15 g/L); pH 7.

(*) Thành phần dung dịch vi lượng SL6: CoCl₂.6H₂O (0,25 g/L); CuCl₂.5H₂O (0,01 g/L); MnCl₂.4H₂O (0,07 g/L); ZnCl₂ (0,1 g/L); NiCl₂.6H₂O (0,01 g/L); Na₂SiO₃.5H₂O (0,01 g/L); FeCl₂.4H₂O (1,8 g/L); H₃BO₃ (0,5 g/L); Na₂MoO₃.3H₂O (0,03 g/L); H₂O 1 lít.

Môi trường TSB (Tryptic Soy Broth) sử dụng để nuôi cấy VK *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* có thành phần: Soya peptone (5 g/L); Tryptone (15 g/L); NaCl (15 g/L) [29].

Môi trường TSA (Tryptic Soy Agar) sử dụng thí nghiệm khả năng đối kháng của VKTQH với *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* gồm: Tryptone 15 (g/L); soytone 5 (g/L); NaCl (15 g/L); agar (15 g/L) [29].

Môi trường xác định khả năng sinh enzyme: Sử dụng môi trường GA thạch (15 g/L agar), bổ sung 1% (w/v) các cơ chất: gelatin, casein, soluble starch, CMC, và tributyrin để xác định khả năng sinh gelatinase, protease, amylase, cellulase và lipase tương ứng .

Môi trường BTH sử dụng trong thí nghiệm tách chiết lipid: cao nấm men (3 g/L); dịch chiết bột đậu tương 2,723 g/L và Mg^{2+} (22 mg/L) [48].

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nhóm phương pháp phân lập vi khuẩn tía quang hợp

2.2.1.1. Làm giàu vi khuẩn tía quang hợp

VKTQH trong các mẫu được làm giàu theo phương pháp của Kumar (2012) có cải biến [46].

Đối với mẫu bùn và mẫu nước được nuôi tích lũy trong chai nhựa 330 mL (kích thước $\phi = 5\text{cm}$, $h = 25\text{cm}$). Lấy 3g mẫu bùn và 60 mL mẫu nước cho vào chai nhựa 330 mL, bổ sung môi trường DSMZ-27 làm đầy các chai này.

Đối với mẫu tôm: khử trùng bề mặt tôm bằng cồn 70°, tách bỏ phần giáp đầu ngực, thu bộ phận tiêu hoá của tôm. Bộ phận tiêu hoá của tôm (gan, tụy và ruột) được nghiền và đồng nhất bằng chày nghiền mẫu trong dung dịch nước muối sinh lý 0,9%. Hỗn hợp dịch nghiền thu được chuyển vào lọ thủy tinh 100 mL chứa môi trường DSMZ-27 để nuôi tích lũy và làm giàu. Mỗi mẫu bao gồm 15-20 ruột tôm.

Chai mẫu làm giàu được đặt dưới bóng đèn sợi đốt 60W, ở nhiệt độ khoảng 30-32°C. Sau 7-10 ngày tiến hành quan sát sự thay đổi màu trên thành chai. Khi thấy xuất hiện các màu đỏ, nâu đỏ bám trên thành chai, điều này cho thấy sự xuất hiện của nhóm VKTQH.

2.2.1.2. Phân lập vi khuẩn tía quang hợp [48]

Sau khoảng 7-10 ngày ủ sáng, thành bình xuất hiện các vạch màu từ nâu đỏ đến đỏ, đây là các sắc tố đặc trưng của nhóm VKTQH. Lấy mẫu từ các vệt màu này cho vào lọ penicillin (chứa môi trường DSMZ-27), trộn đều để tiến hành phân lập theo phương pháp phân lập vi sinh của Nguyễn Lâm Dũng [49]. Các mẫu sau khi ria

cấy trên đĩa petri, được đặt trong túi nilon kín. Để tạo điều kiện kỵ khí, khí nitơ được sử dụng để thay thế không khí trong túi. Sau đó, các túi nilon được đặt dưới bóng đèn sợi đốt với khoảng cách 20 cm tới đèn, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux. Sau khoảng 5-7 ngày, các khuẩn lạc có màu đỏ, hồng đến nâu vàng sẽ xuất hiện, tiếp tục rìa cấy 3 pha để thu được các khuẩn lạc sạch.

2.2.1.3. Xác định hình dạng, kích thước tế bào và phương thức sinh sản của vi khuẩn tía quang hợp

Chủng VKTQH được rìa cấy trên đĩa thạch DSMZ-27, nuôi trong điều kiện kỵ khí - sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ khoảng 30-32°C. Sau 5-7 ngày nuôi cấy, quan sát hình thái khuẩn lạc trên đĩa thạch.

Hình thái và đặc điểm tế bào VKTQH được xác định bằng phương pháp nhuộm gram của Nguyễn Lâm Dũng [49]. Sau đó, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử.

2.2.2. Nhóm phương pháp sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có hoạt tính probiotic

2.2.2.1. Đánh giá khả năng chịu NaCl của các chủng vi khuẩn tía quang hợp phân lập từ nước ngọt

Tiến hành nuôi cấy các chủng VKTQH trong môi trường chứa các nồng độ NaCl khác nhau: 0 g/L; 15 g/L; 30 g/L và 50 g/L, trong lọ penicillin 13 mL (chứa 10 mL môi trường GA), bổ sung 10% (v/v) giống VKTQH. Các lọ được nuôi trong điều kiện vi hiếu khí - sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ khoảng 30-32°C. Sau 4 ngày nuôi cấy, đánh giá sinh trưởng của các chủng VKTQH ở các nồng độ NaCl khác nhau bằng cách đo mật độ quang (ΔOD_{660}) của dịch huyền phù tế bào.

2.2.2.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng của vi khuẩn tía quang hợp [50]

VKTQH được nuôi trong lọ penicillin có thể tích 13 ml (chứa 10 ml môi trường GA), bổ sung NaCl 15 g/L và giống VKTQH 10% (v/v). Các lọ được nuôi trong điều kiện vi hiếu khí - sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ 30-32°C. Sau 4 ngày tiến hành xác định khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH dựa trên mật độ quang của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 660 nm.

2.2.2.3. Sàng lọc vi khuẩn tía quang hợp có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp [29]

Tiền sàng lọc VKTQH có khả năng đối kháng với Vibrio.

Các chủng VK gây bệnh *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* được nuôi trong

môi trường TSB lỏng, nhiệt độ 28-30°C, lắc 150 vòng/phút. Sau 18 giờ nuôi cấy, thu dịch VK và điều chỉnh mật độ tế bào đạt $OD_{660}=0,1$.

Tiến hành nuôi cấy các chủng VKTQH trong môi trường GA lỏng, điều kiện vi hiếu khí - sáng, nhiệt độ 30-32°C. Sau 2 ngày nuôi cấy, thu dịch và điều chỉnh mật độ tế bào $OD_{660}=0,5$; hút 10 μ L mẫu VKTQH nhỏ lên trên bề mặt đĩa thạch (chứa môi trường TSA) và tiếp tục nuôi ở điều kiện vi hiếu khí - sáng trong 5 ngày.

Khi nhiệt độ môi trường TSA đạt khoảng 40°C thì bổ sung 10% giống từng chủng *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* đã chuẩn bị như trên, lắc đều và đổ một lớp mỏng lên trên đĩa thạch chứa môi trường TSA (đã nuôi VKTQH được 5 ngày). Tiếp tục nuôi các đĩa này ở 30-32°C trong 18 giờ. Khả năng đối kháng của các chủng VKTQH với *Vibrio* được xác định thông qua vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc VKTQH trên đĩa thạch TSA.

Xác định khả năng kháng khuẩn của VKTQH

VKTQH được nuôi trong môi trường GA lỏng trong 7 ngày, sau đó tiến hành ly tâm ở 8.000 vòng/15 phút thu dịch nổi. Dịch nổi này được cô đặc bằng phương pháp đông khô sau đó hòa tan lại trong methanol (10%) để được nồng độ đậm đặc gấp 20 lần so với dịch nuôi ban đầu. Hút 50 μ L dịch VK kiểm định lên bề mặt đĩa thạch TSA và trang đều. Tiến hành đục lỗ trên đĩa thạch và hút 120 μ L dịch VKTQH đã được cô đặc nhỏ vào giếng thạch, ủ ở 35°C trong 18 giờ. Đối chứng là methanol 10%. Hoạt tính kháng khuẩn (HTKK) của VKTQH được xác định thông qua vòng vô khuẩn theo công thức: $HTKK = D - d$ (mm). Trong đó, D: Đường kính lỗ khoan + đường kính vòng vô khuẩn; d: Đường kính lỗ khoan.

2.2.2.4. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng sinh enzyme tiêu hóa

Tiền sàng lọc VKTQH có khả năng sinh enzyme [29]

VKTQH được nuôi trong môi trường GA, sau 2 ngày nuôi cấy thu dịch VKTQH điều chỉnh về mật độ $OD_{660}=1$, sau đó hút 10 μ L của từng mẫu nhỏ lên trên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường GA có bổ sung từng loại cơ chất: gelatin, casein, CMC, soluble starch và tributyrin để xác định khả năng sinh enzyme tương ứng gelatinase, protease, cellulase, amylase và lipase. Các đĩa được nuôi trong điều kiện hiếu khí - tối, nhiệt độ phòng, trong 5 ngày. Xác định hoạt tính sinh enzyme thông qua vòng sáng phân giải cơ chất xung quanh khuẩn lạc VKTQH.

Xác định khả năng sinh enzyme của VKTQH

VKTQH được nuôi trong môi trường GA, sau 2 ngày nuôi cấy thu dịch

VKTQH điều chỉnh về mật độ $OD_{660}=1$, sau đó hút 50 μ L từng mẫu nhỏ vào từng giếng thạch trên môi trường GA chứa các cơ chất: gelatin, casein, soluble starch, CMC và tributyrin để xác định khả năng sinh các loại enzyme tương ứng là gelatinae, protease, amylase, cellulase và lipase. Các đĩa được ủ trong điều kiện hiếu khí - tối, nhiệt 30-32°C, trong 5 ngày.

Để quan sát vòng phân giải các cơ chất, tiến hành nhuộm đĩa thạch với: dung dịch Lugol (đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải soluble starch); dung dịch Congo Red 1% (đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải CMC); dung dịch Frazier (đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải gelatin). Hoạt tính enzyme protease và lipase được quan sát trực tiếp trên đĩa thạch chứa cơ chất casein và tributyrin tương ứng. Hoạt tính sinh enzyme (HT) được xác định thông qua vòng phân giải cơ chất theo công thức: $HT = D - d$ (mm). Trong đó, D: Đường kính vòng phân giải + đường kính lỗ khoan; d: Đường kính lỗ khoan.

2.2.2.5. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng chịu acid và muối mật

Khả năng chịu acid trong dạ dày và muối mật trong ruột non được xác định theo phương pháp của Fang và cộng sự (2012) [34].

Chuẩn bị VKTQH: VKTQH được nuôi trong lọ penicillin có thể tích 13 mL (chứa 10 mL môi trường GA lỏng), bổ sung NaCl 15 g/L, giống 10% (v/v), trong điều kiện vi hiếu khí - sáng, nhiệt độ 30-32°C, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux Sau 96 giờ nuôi cấy, hút 1 mL dịch nuôi cấy đem ly tâm 4.000 vòng/5 phút và rửa lại với dung dịch đệm PBS (0,02% KCl; 0,144% Na_2HPO_4 ; 0,8% NaCl và 0,024% KH_2PO_4 ; pH 7).

Chuẩn bị dịch dạ dày mô phỏng: Hòa pepsin trong nước muối vô trùng (0,5%) sao cho nồng độ pepsin cuối cùng đạt 3 g/L, điều chỉnh pH của dịch dạ dày mô phỏng đạt pH 2 bằng HCl và NaOH.

Chuẩn bị dịch ruột non mô phỏng: Pha pancreatin trong nước muối vô trùng (0,5%) sao cho nồng độ cuối cùng đạt 1 g/L. Bổ sung 0,3% muối mật (sodium taurocholate) và dùng NaOH điều chỉnh pH của dung dịch thành pH 8.

Sàng lọc VKTQH có khả năng chịu acid thấp trong dịch dạ dày mô phỏng [34]

Sử dụng ống eppendorf (dung tích 2 mL): Hút 0,2 mL dịch huyền phù tế bào VKTQH đã chuẩn bị ở trên hòa với 0,3 mL nước muối vô trùng (0,5%) và bổ sung thêm 1 mL dịch dạ dày mô phỏng sau khi đã điều chỉnh pH 2. Hỗn hợp được vortex trong 10 giây, sau đó dung dịch được ủ trong 180 phút ở 30°C Khả năng chịu acid

của các chủng VKTQH được đánh giá qua mật độ tế bào sau khi ủ trong 180 phút.

Sàng lọc VKTQH có khả năng chịu muối mật trong dịch ruột non mô phỏng [34]

Sử dụng ống eppendorf (dung tích 2 mL): Hút 0,2 mL dịch huyền phù tế bào VKTQH đã chuẩn bị ở trên hòa với 0,3 mL nước muối vô trùng (0,5%) và bổ sung thêm 1 mL dịch ruột non mô phỏng sau khi đã điều chỉnh pH 8. Trộn đều dung dịch với nhau trong 10 giây, sau đó ủ dung dịch trong 240 phút ở 30°C. Khả năng chịu muối mật của các chủng VKTQH được đánh giá qua mật độ tế bào sau khi ủ trong 240 phút.

Công thức tính phần trăm sống sót được tính: $N_i/N_x \times 100$. Trong đó, $N_i = \log \text{CFU/mL}$ sau thời gian nuôi cấy, $N_x = \log \text{CFU/mL}$ thời gian tại 0 giờ [51].

2.2.2.6. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng tự kết dính

Khả năng tự kết dính được xác định theo phương pháp của Đỗ Thị Bích Thủy và cộng sự (2018) [52] và có cải tiến để phù hợp với đặc điểm sinh trưởng của chủng VKTQH.

Thu sinh khối VKTQH: VKTQH được nuôi cấy trong môi trường GA, trong điều kiện vi hiếu khí - sáng, ở 30-32°C. Sau 4 ngày, tiến hành ly tâm ở 8.000 vòng/15 phút để thu sinh khối, rửa sinh khối bằng đệm phosphat (pH 7.2).

Tái huyền phù sinh khối bằng đệm phosphat, điều chỉnh nồng độ các mẫu để được mật độ cuối cùng $OD_{660}=0,5$. Cuối cùng, phân chia dịch tái huyền phù này vào các lọ penicillin 13 mL (chứa 10 mL dịch), lắc đều và để lắng ở 37°C trong 5 giờ.

Tiến hành đo dịch nuôi ở bước sóng OD_{660} ở các thời điểm 0 và 5 giờ. Tỷ lệ kết dính (%) được tính bằng công thức: $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$. Trong đó: A_t và A_0 là OD_{660} tại thời điểm 5 giờ và 0 giờ [53].

2.2.2.7. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng tạo màng biofilm

Khả năng tạo màng biofilm của các chủng VKTQH được thực hiện theo Nguyễn Thị Minh Nguyệt và cộng sự (2022) [54].

Thu dịch VKTQH sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường GA, ly tâm 3 lần liên tiếp ở 4.000 vòng/phút, trong 10 phút. Sau mỗi lần ly tâm, rửa lại bằng nước cất với thể tích tương ứng. Hòa lại sinh khối bằng nước cất vô trùng và điều chỉnh nồng độ $OD_{660}=0,5$. Hút 100 μL dịch trên cho vào các ống eppendorf 1,5 mL chứa 900 μL môi trường GA. Các mẫu được nuôi tĩnh dưới bóng đèn sợi đốt 60W, nhiệt độ 30-32°C. Sau 7 ngày, xác định khả năng tạo màng biofilm của các chủng VKTQH.

Xác định khả năng tạo màng sinh học: Cân thận hút bỏ dịch nuôi cấy để không làm vỡ màng, rửa nhẹ màng sinh học bằng 1 mL nước cất, hút bỏ nước rửa. Thêm 1 mL dung dịch tím tinh thể 0,1% vào các ống eppendorf, ủ 10 phút để cố định màng. Hút bỏ dung dịch tím tinh thể, rửa liên tiếp 2 lần bằng nước cất (1 mL/lần). Bổ sung 1 mL acetic acid 33%, đảo trộn hỗn hợp. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở bước sóng 570 nm. Sử dụng ống eppendorf không chứa sinh khối VKTQH làm đối chứng âm. Mật độ tế bào trong màng VKTQH tương quan với độ hấp thụ ở 570 nm. Giá trị tạo màng được tính theo công thức: $a=b \times \text{độ pha loãng} \times 10/3$, trong đó a: giá trị tạo màng b: là giá trị OD₅₇₀, 10/3: chỉ số quy đổi từ giá trị OD sang giá trị hấp thụ tím của màng biofilm tạo thành [54].

2.2.2.8. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp sinh tổng hợp lipid và PUFA cao [48]

Các chủng VKTQH được nuôi tích lũy sinh khối trong bình thủy tinh 500 mL chứa môi trường BTH, trong điều kiện kỵ khí - sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ 30-32°C. Sau 4 ngày nuôi cấy, thu sinh khối VKTQH bằng cách bổ sung chitosan với nồng độ từ 150 mg/L, pH 8, khuấy đều trong 30 giây, để ổn định trong 30 phút. Sau khi các tế bào VKTQH lắng xuống tiến hành loại bỏ dịch và thu sinh khối tươi VKTQH bằng cách lọc qua vải. Sinh khối tươi VKTQH có màu nâu đỏ, dạng sệt sau đó được sấy khô ở 70°C trong 18 giờ thu được sinh khối khô. Sinh khối khô được sử dụng để tách chiết lipid và phân tích hàm lượng acid béo PUFA.

Phương pháp xác định hàm lượng lipid

Cân 1 gam (m_1) hỗn hợp sinh khối khô VKTQH sau đó nghiền mịn mẫu. Cho mẫu đã nghiền vào ống ly tâm, bổ sung hỗn hợp dung môi: 5 mL nước cất: 12 mL methanol: 6 mL cloroform. Nghiền đều hỗn hợp, sau đó ly tâm. Bổ sung vào ống ly tâm 6 mL cloroform, vortex đều trong 30 giây. Sau đó, ly tâm hỗn hợp ở 5.000 vòng/phút trong 15 phút để phân lớp. Sau khi ly tâm, hỗn hợp sẽ phân thành hai lớp: Lớp trên chứa nước và methanol, lớp dưới chứa lipid, cloroform và bã sinh khối. Thu lớp dưới chứa lipid và lọc bỏ bã sinh khối. Sử dụng máy cất quay chân không để loại bỏ dung môi và thu được sản phẩm lipid. Cân khối lượng sản phẩm lipid thu được (m_2). Hàm lượng lipid tổng tính theo công thức:

$$\text{Lipid tổng} = (m_2/m_1) \times 100 (\% \text{ TLK})$$

Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng acid béo PUFA

Thành phần và hàm lượng acid béo được phân tích theo phương pháp GC-MS tại Trung tâm nghiên cứu thử nghiệm hoá dược - Viện Khoa học Vật liệu Ứng

dụng. Số 1B, đường TL29, KP1, phường Thanh Lộc, quận 12, Tp. Hồ Chí Minh.

2.2.3. Nhóm phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn

2.2.3.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào

Hình thái khuẩn lạc, tế bào được thực hiện theo phương pháp Mục 2.2.1.3. Hình dạng tế bào được quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử JEOL-5410V tại Viện Vệ sinh Dịch tễ, Hà Nội.

2.2.3.2. Nghiên cứu đặc điểm sắc tố quang hợp [50]

Sắc tố quang hợp *bacteriochlorophyll* của các mẫu VKTQH được quan sát và phân tích trên máy quang phổ UV-1650PC tại bước sóng từ 400-900 nm.

2.2.3.3. Nghiên cứu đặc điểm dinh dưỡng carbon, nitrogen

VKTQH được nuôi trong lọ penicillin có thể tích 13 mL (chứa 10 mL) trong môi trường GA lỏng, ở điều kiện vi hiếu khí - sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ 30-32°C.

Thí nghiệm đối với khả năng sử dụng nguồn carbon khác nhau: loại bỏ hoàn toàn nguồn carbon trong môi trường nuôi và lần lượt thay thế bằng các nguồn carbon khác nhau: acetate, benzoate, citrate, ethanol, formate, fructose, glucose, glutamate, glycerol, malate, peptone, propanol, propionate, pyruvate, succinate (với nồng độ 1 g/L).

Thí nghiệm đối với khả năng sử dụng các nguồn nitrogen khác nhau: loại bỏ hoàn toàn nguồn nitrogen trong môi trường và lần lượt thay thế bằng các nguồn nitrogen: cao nấm men, glutamate, NH_4Cl , urea.

Sau 4 ngày nuôi cấy, sinh trưởng của VKTQH được đánh giá theo mật độ quang của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 660 nm (ΔOD_{660}).

2.2.3.4. Xác định ảnh hưởng của NaCl đến khả năng sinh trưởng [50]

Tiến hành nuôi cấy các chủng VKTQH trong lọ penicillin thể tích 13 mL (chứa 10 mL môi trường GA lỏng) bổ sung các nồng độ NaCl khác nhau từ 0 đến 10% (v/v), ở điều kiện vi hiếu khí - sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ khoảng 30-32°C, bổ sung giống VKTQH 10%. Sau 4 ngày nuôi cấy, sinh trưởng của VKTQH được đánh giá theo mật độ quang của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 660 nm (ΔOD_{660}).

2.2.3.5. Xác định ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng [50]

Tiến hành nuôi cấy các chủng VKTQH trong lọ penicillin thể tích 13 mL (chứa 10 mL môi trường GA lỏng), NaCl 15%, điều chỉnh nồng độ pH từ 4-10. Các

lọ nuôi trong điều kiện vi hiếu khí - sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ khoảng 30-32°C, bổ sung giống VKTQH 10% (v/v). Sau 4 ngày nuôi cấy, sinh trưởng của VKTQH được đánh giá theo mật độ quang của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 660 nm (ΔOD_{660}).

2.2.3.6. Xác định khả năng sử dụng sulfide cho sinh trưởng [50]

VKTQH được nuôi trên môi trường GA lỏng chứa Na_2S ở các nồng độ khác nhau từ 0 đến 5,4 mM, trong lọ penicillin có thể tích 13 ml (chứa 10 ml môi trường), ở điều kiện vi hiếu khí - sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ 30-32°C, bổ sung giống VKTQH 10% (v/v). Sau 4 ngày nuôi cấy, sinh trưởng của VKTQH được đánh giá theo mật độ quang của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 660 nm (OD_{660}).

2.2.4. Định danh các chủng vi khuẩn tia quang hợp

Tách chiết DNA tổng số: VKTQH sau khi nuôi tăng sinh trong môi trường GA được cho vào ống eppendorf 1,5 mL, tiến hành thu sinh khối bằng cách ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút. Sử dụng kit gene JET (Thermo) để tách DNA tổng số, kiểm tra chất lượng DNA bằng điện di trên gel agarose 1%.

Phản ứng PCR: Sử dụng cặp mồi có trình tự mồi xuôi F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và mồi ngược R1 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') do Devereux và Willis thiết kế [55]. Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng thể tích 25 μ L) gồm 12,5 μ L master mix; 1 μ L mồi mỗi loại (10 pmol); 1 μ L DNA khuôn; 9,5 μ L nước cất vô trùng. Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình: 95°C/3 phút; 30 chu kỳ (95°C/30 giây; 50°C/45 giây; 72°C/50 giây; 72°C/8 phút) và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và kiểm tra độ tinh sạch trước khi đọc trình tự.

Sản phẩm PCR được giải trình tự bằng máy giải trình tự gene tự động theo phương pháp sử dụng các dideoxynucleotide của Sanger. Kết quả trình tự nucleotide của gene 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên geneBank bằng chương trình BLAST.

Phân tích trình tự nucleotide và xây dựng cây phát sinh chủng loại: Các phần mềm BLAST và BioEdit được sử dụng để xử lý các trình tự nucleotide. Phần mềm MEGA X được sử dụng để xử lý số liệu và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Neighbor Joining trên cơ sở khoảng cách di truyền theo phương pháp hai tham số của Kimura [56].

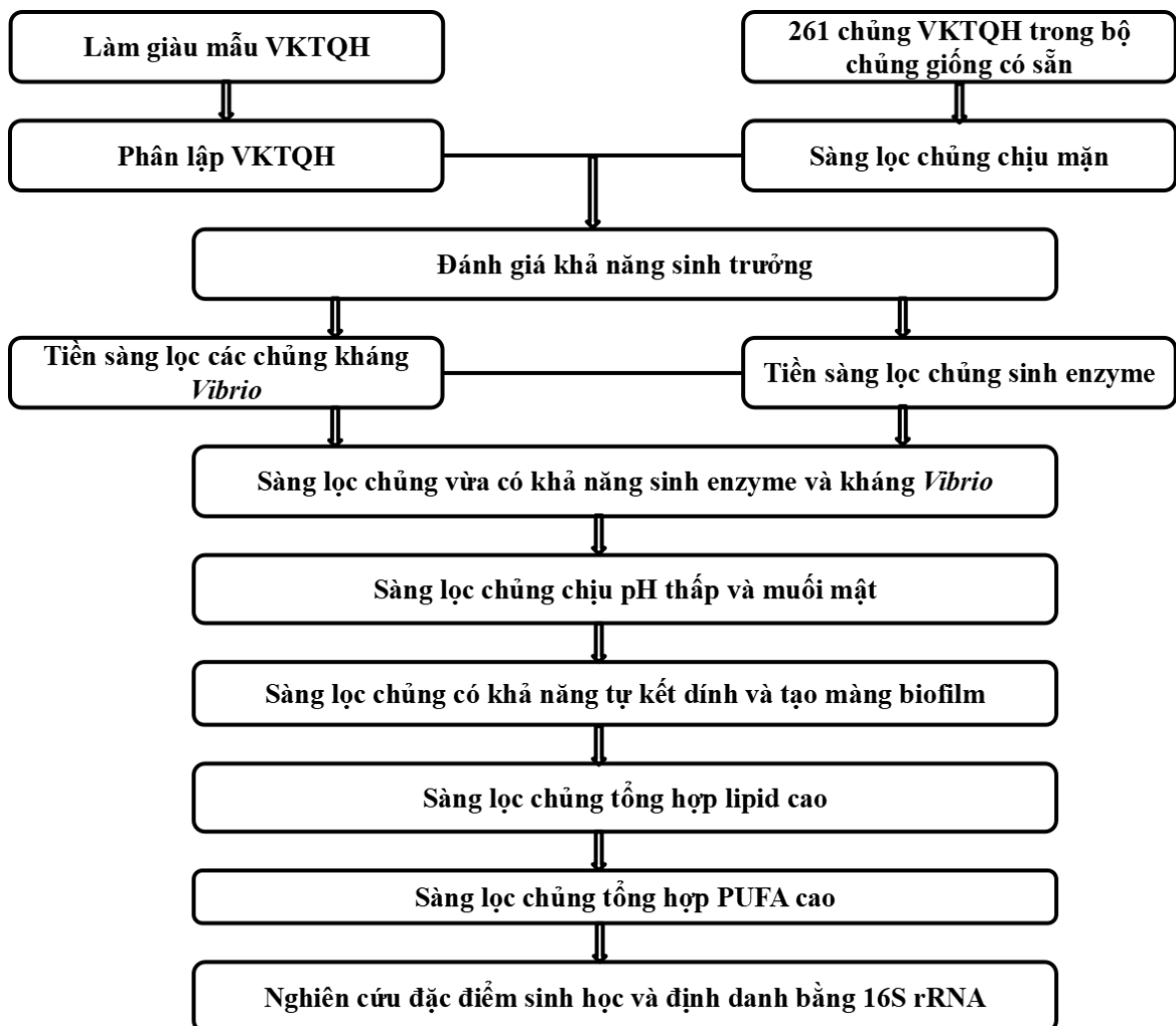
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành ba lần lặp lại. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (TB \pm SD). Số liệu thống kê và biểu đồ được thực hiện bằng Microsoft Excel 2019. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được phân tích bằng ANOVA với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Địa điểm nghiên cứu: Công trình nghiên cứu được tiến hành tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học & Công nghệ Việt Nam.

Toàn bộ quy trình thí nghiệm trong nghiên cứu này đã được thực hiện theo sơ đồ sau:

SƠ ĐỒ QUY TRÌNH THÍ NGHIỆM



CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP TRONG AO NUÔI TÔM THỂ CHÂN TRẮNG Ở 3 MIỀN BẮC, TRUNG, NAM CỦA VIỆT NAM

3.1.1. Làm giàu vi khuẩn tia quang hợp

270 mẫu (bùn, nước và ruột tôm) thu tại các ao nuôi tôm ở 3 miền (6 tỉnh) được làm giàu bằng cách nuôi tích lũy trong môi trường DSMZ-27 dịch lỏng ở điều kiện kỵ khí, cường độ chiếu sáng 5.000 lux, nhiệt độ khoảng 30-32°C. Sau 7-10 ngày hầu hết các chai nhựa làm giàu đều chuyển sang màu đỏ đậm, đỏ nâu, đỏ hồng... Đây là những sắc tố đặc trưng của nhóm VKTQH. Kết quả làm giàu được trình bày ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Làm giàu VKTQH từ các mẫu bùn, nước và ruột tôm thu tại các ao nuôi TTCT ở 3 miền

Mẫu		Bùn		Nước		Ruột tôm	
		Tổng số mẫu thu	Số mẫu xuất hiện sắc tố của nhóm VKTQH	Tổng số mẫu thu	Số mẫu xuất hiện sắc tố của nhóm VKTQH	Tổng số mẫu thu	Số mẫu xuất hiện sắc tố của nhóm VKTQH
Miền Bắc	Hải Phòng	15	15	15	12	15	5
	Nam Định	15	15	15	15	15	6
Miền Trung	Nha Trang	15	15	15	13	15	7
	Phú Yên	15	15	15	10	15	6
Miền Nam	Bạc Liêu	15	15	15	13	15	9
	Sóc Trăng	15	15	15	13	15	8
Tổng số		90	90	90	76	90	41

Từ kết quả từ Bảng 3.1 cho thấy trong tổng số 270 mẫu có 207 mẫu xuất hiện màu sắc đặc trưng của nhóm VKTQH bao gồm: 90 mẫu bùn, 76 mẫu nước và 41 mẫu ruột tôm. Như vậy, sau khi tiến hành làm giàu VKTQH, tỷ lệ số mẫu xuất hiện sắc tố đặc trưng của nhóm VKTQH so với số mẫu thu thập được lần lượt đạt 100% mẫu bùn; 84,4% mẫu nước và 45,5% mẫu ruột tôm.

3.1.2. Phân lập, làm sạch vi khuẩn tia quang hợp

Các mẫu làm giàu sau khi xuất hiện sắc tố được sử dụng để phân lập VKTQH. Kết quả phân lập VKTQH từ các mẫu bùn, nước, ruột tôm thu tại các ao nuôi TTCT được trình bày ở Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Phân lập VKTQH từ các mẫu bùn, nước và ruột tôm thu tại các ao nuôi TTCT ở 3 miền

Địa chỉ thu mẫu		Mẫu	Số chủng VKTQH phân lập được từ			
			Bùn	Nước	Ruột tôm	Tổng số
Miền Bắc	Hải Phòng		38	22	10	70
	Nam Định		43	28	14	85
Miền Trung	Nha Trang		49	34	20	103
	Phú Yên		48	31	19	98
Miền Nam	Bạc Liêu		50	33	26	109
	Sóc Trăng		48	30	21	99
Tổng số			276	178	110	564

Như vậy, từ 207 mẫu bùn, nước và ruột tôm có biểu hiện sắc tố quang hợp đặc trưng cho nhóm VKTQH đã phân lập và làm sạch được 564 chủng VKTQH bao gồm: Miền Bắc (Hải Phòng: 70 chủng; Nam Định: 85 chủng); Miền Trung (Nha Trang: 103 chủng, Phú Yên: 98 chủng) và Miền Nam (Bạc Liêu: 109 chủng, Sóc Trăng: 99 chủng).

3.1.3. Một số đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tía quang hợp

Sau khi tiến hành phân lập và làm sạch, các chủng VKTQH được xác định một số đặc điểm sinh học bao gồm: Màu sắc khuẩn lạc, hình dạng tế bào và phương thức sinh sản. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Một số đặc điểm sinh học của các chủng VKTQH phân lập được từ các ao nuôi TTCT ở 3 miền

Địa chỉ thu mẫu		Đặc điểm	Màu sắc khuẩn lạc				Hình dạng tế bào và phương thức sinh sản		Tổng số chủng phân lập
			Đỏ tía	Đỏ nâu	Hồng	Nâu vàng	Hình que, gậy, sinh sản nảy chồi	Hình cầu, oval, trứng, bầu dục, sinh sản phân đôi	
Miền Bắc	Hải Phòng		40	18	4	8	3	67	70
	Nam Định		47	21	5	12	3	82	85
Miền Trung	Nha Trang		65	24	5	9	2	101	103
	Phú Yên		55	24	3	16	3	95	98
Miền Nam	Bạc Liêu		65	21	4	19	5	104	109
	Sóc Trăng		52	23	6	18	2	97	99
Tổng			324	131	27	82	18	546	564

Từ Bảng 3.3 cho thấy:

Về màu sắc khuẩn lạc: trong 564 chủng VKTQH phân lập ở 3 miền, đa số các chủng VKTQH có khuẩn lạc màu đỏ tía (chiếm 57,45%); sau đó đến đỏ nâu (chiếm 23,23%); nâu vàng (chiếm 14,54%) và cuối cùng là màu hồng (chiếm 4,79%).

Về hình dạng tế bào và phương thức sinh sản: dựa theo khóa phân loại của Bergey [18] VKTQH có thể được chia thành 2 nhóm chính như sau:

- Nhóm 1 (chiếm 96,81%): Tế bào hình trứng, hình cầu, oval, sinh sản theo kiểu phân đôi. Đây là các đặc điểm hình thái đặc trưng của nhóm VKTQH thuộc các chi: *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Rhodobaca*, *Rhodovibrio*.
- Nhóm 2 (chiếm 3,19%): Tế bào hình gậy, hình que, sinh sản theo phương thức nảy chồi. Đây là các đặc điểm hình thái đặc trưng của nhóm VKTQH thuộc các chi: *Rhodopseudomonas*, *Rhodobium*, *Rhodoplanes*, *Rhodoblastus*, *Rhodomicrobium*.

Khi nghiên cứu về sự đa dạng sinh thái trong ao nuôi tôm, Kumar và cộng sự (2012) đã phân lập được 210 chủng VKTQH từ 155 mẫu nước và trầm tích trong các ao nuôi tôm nước lợ và nước mặn tại Ấn Độ. Trong số 210 chủng phân lập được phần lớn các chủng VKTQH thuộc các chi *Rhodobacter* (34,28%), *Phaeovibrio* (30%), *Rhodovulum* (26,19%) và *Rhodobium* (9,52%) [46].

Mukkata và cộng sự (2015) đã nghiên cứu về sự đa dạng của VKTQH không lưu huỳnh trong các mẫu nước và trầm tích thu tại 16 ao nuôi tôm sú ở các vùng ven biển Thái Lan. Kết quả cho thấy, VKTQH chiếm 8,6% (trong đó 5,7% thuộc nhóm α -*Proteobacteria* và 2,9% nhóm thuộc β -*Proteobacteria*) trong các mẫu nước. Một số loài cụ thể được xác định là *Rbi. marinum*, *Rhv. sulfidophilum*. Trong các mẫu trầm tích, VKTQH chiếm tỷ lệ cao hơn 22,3% (trong đó 16,7% thuộc nhóm α -*Proteobacteria* và 5,6% thuộc nhóm β -*Proteobacteria*). Một số loài VKTQH được xác định trong các mẫu trầm tích bao gồm: *Rhv. kholense*, *Rsp. centenum*, *Rbi. marinum* và *Rub. gelatinosus* [57].

Như vậy, từ kết quả phân lập VKTQH trong ao nuôi tôm ở nghiên cứu này và các nghiên cứu khác cho thấy hệ sinh thái VKTQH trong ao nuôi tôm rất đa dạng. Đa số VKTQH xuất hiện trong ao nuôi tôm thuộc các chi *Rhodobacter*, *Rhodovulum* và *Rhodobium*.

Để tuyển chọn được các chủng VKTQH đáp ứng nhiều các chỉ tiêu probiotic như: Đối kháng với vi khuẩn gây bệnh, sinh tổng hợp enzyme tiêu hóa, chịu được

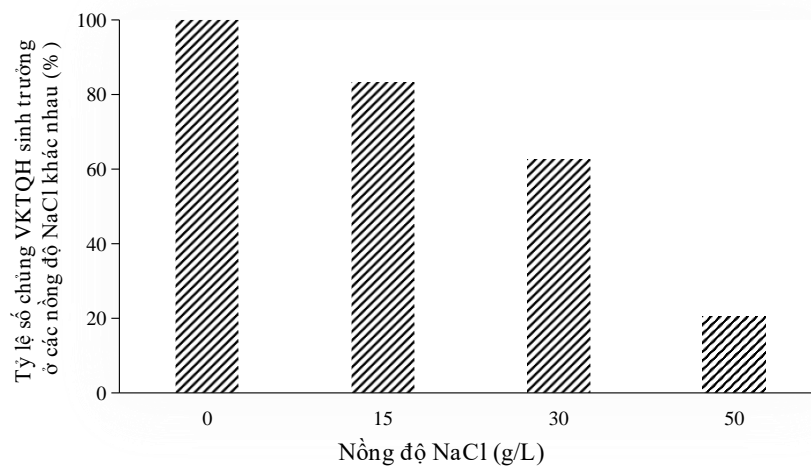
môi trường pH thấp và muối mật và có khả năng bám dính nên ngoài 564 chủng VKTQH được phân lập từ các ao nuôi TTCT, 261 chủng VKTQH từ bộ sưu tập chủng giống hiện đang được lưu giữ tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học được sử dụng để có bộ chủng giống VK sàng lọc đa dạng nguồn phân lập.

3.2. SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP CÓ HOẠT TÍNH PROBIOTIC

3.2.1. Khả năng chịu muối của các chủng vi khuẩn tía quang hợp phân lập từ các nguồn nước ngọt

Với mục đích ứng dụng các chủng VKTQH làm chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi TTCT nước lợ và nước mặn, nên các chủng VKTQH được tuyển chọn phải sinh trưởng tốt ở các nồng độ NaCl khoảng 15 g/L (nước lợ) và 25-35 g/L (nước mặn) và 50 g/L (trong đáy ao nuôi thủy sản). Do vậy, khả năng chịu muối của 136 chủng VKTQH phân lập từ các nguồn nước ngọt trong tổng số 261 từ bộ chủng giống được lưu giữ tại phòng thí nghiệm đã được xác định.

Để xác định khả năng chịu NaCl, các chủng VKTQH được nuôi cấy trên môi trường GA lỏng, bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau: 0 g/L, 15 g/L, 30 g/L, 50 g/L. Cách thức tiến hành như đã nêu trong phần phương pháp. Sau 4 ngày nuôi cấy khả năng sinh trưởng (theo ΔOD_{660}) của các chủng VKTQH nghiên cứu được xác định và kết quả được trình bày ở Hình 3.1.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ muối (NaCl) đến khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH phân lập từ các nguồn nước ngọt

Từ Hình 3.1 cho thấy, các chủng VKTQH đều sinh trưởng mạnh trong môi trường nước ngọt (nồng độ NaCl 0%) với tỷ lệ 100%. Khi tăng nồng độ muối lên 15 g/L, 30 g/L và 50 g/L số lượng chủng VKTQH chịu mặn giảm, tỷ lệ lần lượt là 83,09% (113 chủng); 62,50% (85 chủng) và 20,59% (28 chủng) tương ứng.

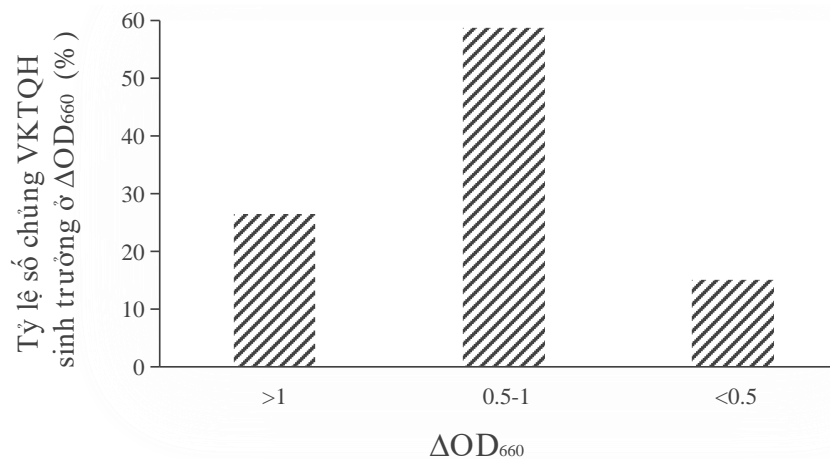
Mục tiêu của nghiên cứu là tuyển chọn các chủng VKTQH sinh trưởng được trong môi trường nuôi TTCT nước lợ và nước mặn nên nồng độ NaCl 30 g/L được lựa chọn để tuyển chọn các chủng VKTQH phân lập từ nguồn nước ngọt có khả năng chịu muối. Do vậy, 85 chủng VKTQH có khả năng sinh trưởng ở nồng độ muối 30 g/L được lựa chọn để tiến hành sàng lọc các đặc tính probiotic.

Như vậy, đã phân lập và sàng lọc được 774 chủng VKTQH bao gồm: 564 chủng VKTQH phân lập được trong ao NTTCT ở 3 miền và 210 chủng VKTQH được lưu giữ tại phòng thí nghiệm (125 chủng phân lập tại các nguồn nước mặn và 85 chủng phân lập từ các nguồn nước ngọt) được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2. Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn tía quang hợp

Một trong những tiêu chí quan trọng để lựa chọn các chủng VK tạo chế phẩm sinh học là chúng phải có khả năng sinh trưởng nhanh, mật độ sinh khối cao. Vì vậy, khả năng sinh trưởng (theo ΔOD_{660}) của tất cả các chủng VKTQH đã được xác định.

Các chủng VKTQH nghiên cứu được nuôi cấy trong môi trường GA, trong điều kiện vi hiếu khí - sáng. Sau 4 ngày nuôi cấy, khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH được xác định theo mật độ quang của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 660 nm. Kết quả được trình bày ở Hình 3.2.



Hình 3.2. Khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH nghiên cứu

Từ Hình 3.2 cho thấy trong số 774 chủng VKTQH có 204 chủng có khả năng sinh trưởng (ΔOD_{660}) lớn hơn 1 (chiếm 26,36%); 454 chủng có khả năng sinh trưởng (ΔOD_{660}) dao động từ 0,5-1 (chiếm 58,66%) và 116 chủng có khả năng sinh trưởng (theo ΔOD_{660}) thấp hơn 0,5 (chiếm 14,99%).

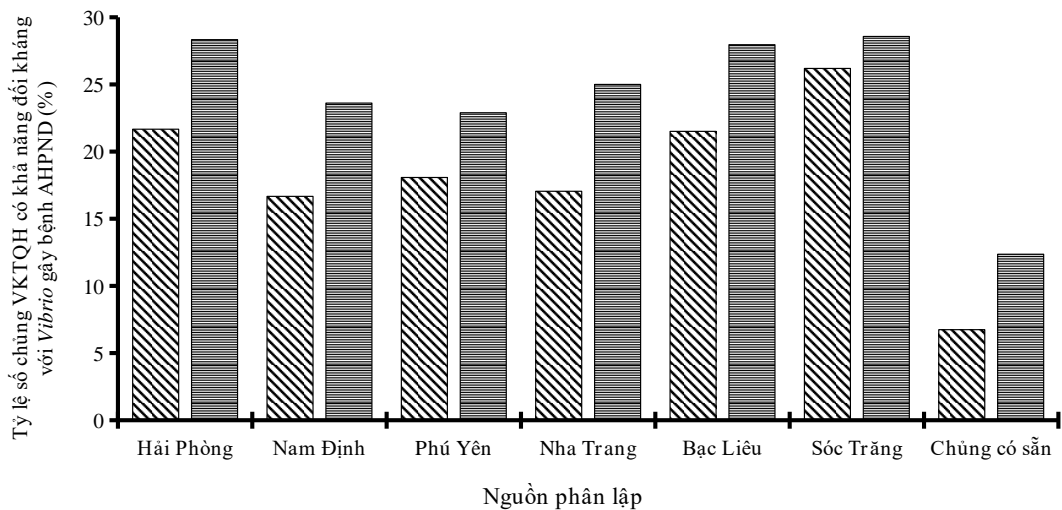
Như vậy, 658 chủng VKTQH có khả năng sinh trưởng tốt (giá trị $\Delta OD_{660} \geq 0,5$) đã được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp và sinh enzyme tiêu hoá thức ăn

3.2.3.1. Tiền sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp

Do số lượng chủng VKTQH cần sàng lọc các chỉ tiêu probiotic khá lớn (658 chủng) nên trước khi xác định đường kính vòng kháng khuẩn, các chủng VKTQH được tiến hành tiền sàng lọc khả năng đối kháng với VK gây bệnh AHPND.

Tiền sàng lọc khả năng đối kháng của 658 chủng VKTQH với 2 chủng VK kiểm định *V. parahaemolyticus* BLV.10 và *V. harveyi* gây bệnh AHPND được tiến hành như đã nêu trong phần phương pháp, kết quả trình bày ở Hình 3.3.



Hình 3.3. Khả năng đối kháng (%) của các chủng VKTQH phân lập từ các ao nuôi TTCT ở 3 miền với VK gây bệnh AHPND *V. parahaemolyticus* (▨) và *V. harveyi* (■)

Kết quả từ Hình 3.3 cho thấy:

- **Khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* BLV.10:** Trong tổng số 658 chủng VKTQH có 109 chủng (chiếm 16,57%) có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*. Trong đó: Sóc Trăng có số chủng cao nhất (chiếm 26,91%) tiếp đến là Hải Phòng (chiếm 21,67%); Bạc Liêu (chiếm 21,51%); Phú Yên (chiếm 18,07%); Nha Trang (chiếm 17,05%); Nam Định (chiếm 16,67%). Nhóm VK từ bộ sưu tập chủng giống trong phòng thí nghiệm có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* thấp nhất (chiếm 6,74%).
- **Khả năng đối kháng với *V. harveyi*:** Trong tổng số 658 chủng VKTQH có 147 chủng (chiếm 22,34%) có khả năng đối kháng với *V. harveyi*. Trong đó: Sóc Trăng có số chủng cao nhất (chiếm 28,57%) tiếp đến là Hải Phòng

(chiếm 28,33%); Bạc Liêu (chiếm 27,96%); Nha Trang (chiếm 25%); Phú Yên (chiếm 22,89%) và Nam Định (chiếm 23,61%). Thấp nhất là nhóm VK từ bộ sưu tập chủng giống trong phòng thí nghiệm có khả năng đối kháng với *V. harveyi* (chiếm 12,36%).

Trong tổng số 658 chủng VKTQH, các chủng VKTQH từ bộ sưu tập chủng giống phòng thí nghiệm có tỷ lệ đối kháng với VK gây bệnh AHPND thấp nhất chiếm 6,74% (*V. parahaemolyticus* BLV.10) và 12,36% (*V. harveyi*). Nguyên nhân có thể do các chủng VKTQH này được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như: vùng ven biển, ao đầm nuôi thủy sản, nước thải nhà máy sản xuất sữa đậu nành, nước thải sinh hoạt, các ruộng lúa, không phải là các chủng VSV bản địa, phân lập tại ao nuôi tôm nên khả năng đối kháng với nhóm VK gây bệnh AHPND thấp hơn so với các chủng VKTQH bản địa trong ao nuôi tôm.

Trong 2 loại VK kiểm định, tỷ lệ các chủng VKTQH kháng *V. harveyi* cao hơn so với nhóm kháng *V. parahaemolyticus* BLV.10, kết quả thí nghiệm cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Rattanachua và cộng sự (2010). Theo tác giả, nguyên nhân các chủng VK có khả năng đối kháng *V. harveyi* cao hơn so với kháng *V. parahaemolyticus* do các chủng *V. parahaemolyticus* có khả năng chống chịu tốt hơn với các hợp chất kháng khuẩn sinh ra từ VK so với *V. harveyi* [58].

Seangtumnor và cộng sự (2018) đã sử dụng phương pháp khuếch tán phủ lớp thạch (overlay diffusion) để tiền sàng lọc các chủng VKTQH có khả năng ức chế *Vibrio* gây bệnh AHPND trên tôm. Kết quả cho thấy, trong số 22 chủng VKTQH phân lập từ các ao nuôi tôm ở Thái Lan có 12 chủng VKTQH (chiếm 54,55%) có khả năng đối kháng với *Vibrio* spp. Từ kết quả nghiên cứu, tác giả đã kết luận hơn 50% số chủng VKTQH phân lập từ ao nuôi tôm có khả năng ức chế 1 trong 2 loài *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND. Trong đó, có một số chủng VKTQH có khả năng ức chế được nhiều loài *Vibrio*. Điều này cho thấy việc lựa chọn nguồn phân lập là một bước quan trọng để sàng lọc chủng VKTQH có tiềm năng kháng *Vibrio* gây bệnh AHPND trong ao nuôi tôm [30].

Như vậy, trong tổng số 658 chủng VKTQH được tiền sàng lọc khả năng đối kháng với *Vibrio* gây bệnh có: 109 chủng (chiếm 16,57%) có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* BLV.10; 147 chủng (chiếm 22,34 %) có khả năng đối kháng với *V. harveyi*; 65 chủng (chiếm 9,88%) có khả năng đối kháng với cả 2 chủng VK kiểm định *V. parahaemolyticus* BLV.10 và *V. harveyi* và 191 chủng (chiếm 29,03%) có khả năng đối kháng với 1 trong 2 loài hoặc cả 2 loài VK kiểm định nêu trên.

3.2.3.2. Tiền sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng sinh enzyme tiêu hoá thức ăn

Một trong những tiêu chuẩn lựa chọn VSV làm probiotic trong NTTS là khả năng sinh enzyme ngoại bào bao gồm: Gelatinase, protease, amylase, cellulase, lipase,...bởi các enzyme này đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp vật nuôi dễ hấp thụ dinh dưỡng, từ đó tăng trọng lượng, đồng thời giúp phân hủy thức ăn tồn đọng trong ao để cải thiện chất lượng nước ao nuôi, giảm dịch bệnh.

Cũng như xác định khả năng kháng khuẩn, tiền sàng lọc 658 chủng VKTQH có khả năng sinh enzyme ngoại bào đã được tiến hành. Cách thức tiến hành như đã nêu trong phần phương pháp. Sau 5 ngày, khả năng sinh enzyme thông qua vòng phân giải cơ chất xung quanh khuẩn lạc trên đĩa thạch của các chủng VKTQH được xác định. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Khả năng sinh tổng hợp enzyme của các chủng VKTQH phân lập được từ các ao nuôi TTCT ở 3 miền

Nguồn phân lập VK		Số chủng VKTQH dùng để sàng lọc	Số chủng VKTQH sinh tổng hợp enzyme					Tổng số chủng VKTQH sinh enzyme của từng tỉnh
			Gelatinase	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase	
Miền Bắc	Hải Phòng	60	18	17	9	2	3	35
	Nam Định	72	12	15	10	3	3	25
Miền Trung	Nha Trang	88	19	21	9	5	11	34
	Phú Yên	83	14	15	12	5	8	31
Miền Nam	Bạc Liêu	93	11	13	11	2	4	29
	Sóc Trăng	84	15	16	10	3	5	36
VKTQH trong bộ sưu tập		178	34	38	13	14	11	86
Tổng số chủng		658	123	135	74	34	45	276

Từ Bảng 3.4 cho thấy, trong số 658 chủng VKTQH có 276 chủng có khả năng sinh enzyme ngoại bào. Trong đó, có một số chủng VKTQH có khả năng sinh 1, 2 hoặc 3 enzyme tiêu hoá thức ăn. Trong đó, tỷ lệ sinh enzyme của các chủng VKTQH từ bộ sưu tập chủng giống trong phòng thí nghiệm cao nhất (chiếm 31,16%); tiếp đến là Sóc Trăng (chiếm 13,04%); Hải Phòng (chiếm 12,68%) Bạc Liêu (chiếm 10,51%); Nha Trang (chiếm 12,32%); Phú Yên (chiếm 11,23%); và cuối cùng là Nam Định (chiếm 9,06%).

Trong số 658 chủng VKTQH, các chủng có nguồn gốc từ bộ sưu tập chủng

giống trong phòng thí nghiệm chiếm tỷ lệ sinh enzyme phân giải cao nhất, nguyên nhân có thể do các chủng VKTQH này được phân lập từ nhiều nguồn nước thải ô nhiễm như: vùng ven biển, ao đầm nuôi thủy sản, nước thải... Đây là những vùng chứa nhiều chất hữu cơ. Vì vậy, các chủng ô nhiễm này sẽ tập trung nhiều chủng VK có khả năng sinh enzyme phân giải hơn so với ao nuôi tôm.

Từ 658 chủng VKTQH tiền sàng lọc được 276 chủng có khả năng sinh enzyme (chiếm 41,94%). Trong 276 chủng, tỷ lệ enzyme protease cao nhất (chiếm 48,91%). Tiếp đến là sinh tổng hợp gelatinase (chiếm 44,56%); amylase (chiếm 26,81%) và lipase (chiếm 16,30%) và thấp nhất là khả năng sinh tổng hợp cellulase (chiếm 12,32%).

Seangtumnor và cộng sự (2018) đã tiến hành nghiên cứu khả năng sinh protease của 22 chủng VKTQH phân lập được từ các ao nuôi tôm Thái Lan. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 18 chủng VKTQH (chiếm 81,82 %) có khả năng sinh enzyme phân giải protein trong cả 2 điều kiện hiếu khí - tối và vi hiếu khí - sáng [30].

Như vậy, từ kết quả trong nghiên cứu này cũng như các kết quả nghiên cứu khác trên thế giới, khả năng sinh enzyme protease của các chủng VKTQH thường cao hơn so với các loại enzyme khác trong ao nuôi tôm, nguyên nhân có thể do trong thức ăn nuôi tôm chứa hàm lượng protein cao hơn so với các thành phần khác, cụ thể là: 14% tinh bột, 46% protein và 8% lipid [30]. Thức ăn dư thừa dẫn đến hàm lượng protein tồn đọng trong ao nuôi tôm cao. Vì vậy, VK có khả năng sinh protease sẽ nhiều hơn các VK sinh enzyme khác trong ao nuôi tôm.

3.2.3.3. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp vừa có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp và vừa sinh enzyme tiêu hóa

Từ 119 chủng VKTQH có khả năng đối kháng với 1 trong 2 loài hoặc cả 2 loài VK gây bệnh *V. parahaemolyticus* BLV10 và *V. haveyi* và 276 chủng có khả năng sinh enzyme ở kết quả tiền sàng lọc, đã lựa chọn được 61 chủng VKTQH vừa có khả năng đối kháng với VK gây bệnh và vừa có khả năng sinh 1 hoặc nhiều enzyme tiêu hóa. Khả năng đối kháng (dựa vào kích thước vòng kháng khuẩn) và khả năng sinh enzyme: gelatinase, protease, amylase, cellulase và lipase (dựa vào vòng phân giải cơ chất) của 61 chủng VKTQH được xác định và kết quả trình bày ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Khả năng đối kháng với hai loài VK kiểm định (*V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*) và sinh enzyme tiêu hóa của các chủng VKTQH lựa chọn

STT	Tên chủng	Khả năng đối kháng với VK kiểm định (mm)		Khả năng sinh enzyme (mm)				
		<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	Gelatinase	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase
1	HP10	10,31±0,77	8,01±0,72	-	6,87±0,94	5,47±0,87	-	-
2	HP11	5,29±0,23	-	-	5,85±0,72	-	3,89±1,24	-
3	HP19	7,95±1,08	-	-	-	-	3,11±1,04	-
4	HP22	-	20,11±1,31	5,73±1,45	-	5,93±1,15	-	-
5	HP30	-	10,91±1,39	-	-	8,66±1,20	-	-
6	HP31	16,94±1,82	-	9,78±0,92	-	-	-	-
7	HP40	-	12,95±1,20	-	-	6,38±1,59	-	-
8	HP43	-	8,59±1,25	-	5,65±0,41	-	-	-
9	HP70	8,11±1,88	-	5,34±1,57	8,56±0,77	-	-	-
10	ND20	5,63±1,24	4,03±1,01	-	9,96±1,35	-	-	3,16±0,15
11	ND25	12,89±1,30	-	4,65±0,76	-	-	-	-
12	ND37	-	5,65±1,06	-	5,46±0,92	9,78±1,12	-	4,75±0,47
13	ND40	12,18±1,08	6,22±0,23	-	3,45±0,37	-	-	6,56±1,02
14	ND42	14,66±0,31	-	3,38±0,64	5,23±1,40	-	-	-
15	ND74	-	6,16±1,16	6,87±0,97	4,34±0,73	-	-	5,24±1,05
16	ND80	10,19±1,21	-	6,34±0,73	5,24±0,77	-	-	6,14±1,28
17	ND85	-	19,29±1,17	-	-	-	6,78±1,12	-
18	NT1	-	4,05±1,39	-	10,26±1,74	-	5,68±1,55	-
19	NT10	5,93±0,94	6,29±1,02	-	-	5,32±1,39	3,78±1,35	-

STT	Tên chủng	Khả năng đối kháng với VK kiểm định (mm)		Khả năng sinh enzyme (mm)				
		<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	Gelatinase	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase
20	NT20	-	10,04±1,04	-	6,39±0,77	-	-	-
21	NT40	6,02±1,06	-	5,23±1,51	-	-	-	-
22	NT43	6,94±1,70	5,87±1,21	4,12±0,88	-	4,78±0,34	-	-
23	NT50	-	8,13±1,76	-	-	-	-	9,81±0,85
24	NT52	-	11,92±1,57	3,78±0,82	4,64±0,68	-	-	5,34±1,16
25	NT64	13,41±0,61	-	-	-	4,23±0,75	3,02±1,57	-
26	NT65	6,49±1,96	-	4,98±0,91	-	6,34±0,86	-	-
27	NT67	5,28±0,85	4,93±0,81	-	3,55±1,05	-	-	-
28	NT69	4,05±1,01	-	5,34±1,06	-	12,27±1,31	-	-
29	NT75	5,45±0,78	-	4,11±0,79	4,28±1,24	-	-	9,56±0,12
30	NT86	5,13±1,44	-	7,81±1,39	-	10,25±0,34	-	-
31	NT95	9,95±2,03	-	-	9,97±0,69	-	-	7,89±1,04
32	PY19	-	6,32±0,75	9,34±1,40	3,23±1,18	5,32±0,91	-	9,11±0,09
33	PY20	-	9,15±1,11	7,45±1,48	6,99±0,94	4,23±0,51	-	-
34	PY21	8,21±1,00	-	4,91±1,53	-	-	7,83±0,74	-
35	PY24	8,12±1,99	-	-	5,77±1,20	-	-	-
36	PY26	9,18±0,31	-	-	9,78±1,45	-	-	-
37	PY30	7,69±1,88	-	-	-	-	3,96±0,67	-
38	PY35	9,95±1,54	8,56±1,05	-	-	6,67±0,73	-	-
39	ST15	-	5,49±0,94	-	5,45±0,86	-	-	-
40	ST20	10,89±1,04	5,95±1,10	-	11,12±1,22	4,08±0,32	-	7,39±0,85
41	ST25	9,14±0,98	-	5,78±1,51	-	-	-	4,89±1,44

STT	Tên chủng	Khả năng đối kháng với VK kiểm định (mm)		Khả năng sinh enzyme (mm)				
		<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	Gelatinase	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase
42	ST30	-	8,93±1,16	3,91±1,53	-	-	-	-
43	ST36	5,91±0,94	9,11±1,39	-	6,06±0,98	-	4,56±1,22	-
44	ST45	-	10,59±1,60	-	5,34±0,82	-	-	-
45	ST52	-	21,94±1,54	-	8,94±0,68	-	-	-
46	ST53	-	9,68±1,45	-	7,56±1,57	-	-	-
47	ST61	-	10,12±1,90	4,58±0,72	-	-	-	-
48	ST70	11,92±0,45	4,04±1,95	-	9,19±0,85	-	-	-
49	ST87	-	4,16±1,77	6,06±0,70	-	-	-	-
50	BL102	-	8,38±1,35	-	-	5,06±1,34	-	-
51	BL29	-	9,39±1,29	-	-	-	-	3,56±0,75
52	BL40	-	18,96±1,74	-	-	-	3,30±0,97	-
53	BL48	8,95±1,98	-	-	3,61±0,86	-	-	-
54	BL69	-	11,91±0,94	-	3,46±1,18	-	-	-
55	BL82	-	19,04±1,15	-	-	5,62±0,71	-	-
56	BL84	-	8,76±1,85	9,85±0,85	-	-	-	-
57	BL85	-	10,95±1,42	-	-	5,37±0,56	-	-
58	BL93	9,92±1,92	-	-	-	10,94±0,46	-	-
59	BL98	-	10,08±1,34	-	-	-	9,60±1,39	-
60	BN8	6,25±1,10	4,52±0,78	-	-	9,25±1,27	10,51±1,44	7,19±0,97
61	ND33	-	7,87±0,99	-	-	-	-	9,87±1,88

Ghi chú: (-) không có khả năng sinh vòng đối kháng; không có khả năng sinh vòng phân giải enzyme.

Về khả năng đối kháng với VK kiểm định (*V. parahaemolyticus* BLV10 và *V. harveyi*)

Kết quả Bảng 3.5 cho thấy, trong số 61 chủng VKTQH có khả năng ức chế VK gây bệnh *Vibrio* có:

- 32 chủng VKTQH có khả năng đối kháng với VK gây bệnh *V. parahaemolyticus* BLV10, trong đó 9 chủng có đường kính vòng kháng khuẩn > 10 mm ký hiệu là: HP10, HP31, ND25, ND40, ND42, ND80, NT64, ST20, ST70.
- 40 chủng VKTQH có khả năng đối kháng với *V. harveyi*, trong đó 14 chủng có vòng kháng khuẩn > 10 mm ký hiệu là: HP22, HP30, HP40, ND85, NT20, NT52, ST45, ST52, ST61, BL40, BL69, BL82, BL85, BL98.
- 11 chủng VKTQH có khả năng đối kháng với cả 2 loại *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* ký hiệu là: HP10, ND20, ND40, NT10, NT43, NT67, PY35, ST20, ST36, ST70, BN8.

Chumpoll và cộng sự (2017) đã sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để đánh giá khả năng đối kháng của 3 chủng VKTQH (SS15, TKW17, STW181) với *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*. Dịch nuôi cấy của 3 chủng VKTQH này sau khi ly tâm, thu dịch nổi và đông khô để cô đặc gấp 15-20 lần được nhỏ vào các giếng trên đĩa thạch TSA đã cấy VK *Vibrio* gây bệnh AHPND. Kết quả cho thấy, cả 3 chủng VKTQH đều có khả năng ức chế *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*. Tuy nhiên khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* yếu hơn so với *V. harveyi*. Trong đó, chủng SS15 có khả năng ức chế *V. harveyi* mạnh nhất đối với đường kính vòng kháng khuẩn là 18,10 mm, chủng TKW17 thể hiện khả năng ức chế mạnh nhất với *V. parahaemolyticus* với vòng kháng khuẩn 13,21 mm [29].

Về khả năng sinh enzyme tiêu hóa

- 22 chủng VKTQH có khả năng sinh gelatinase, trong đó 3 chủng có đường kính vòng phân giải > 9 mm ký hiệu là: HP31, PY19, BL84.
- 29 chủng VKTQH có khả năng sinh protease, trong đó 6 chủng có đường kính vòng phân giải > 9 mm ký hiệu là: ND20, NT1, NT95, PY26, ST20, ST70.
- 20 chủng VKTQH khả năng sinh amylase, trong đó 5 chủng có đường kính vòng phân giải > 9 mm ký hiệu là: ND37, NT69, NT86, BL93, BN8.

- 11 chủng VKTQH có khả năng sinh cellulase, trong đó 2 chủng có đường kính vòng phân > 9 mm ký hiệu là: BL98, BN8.
- 15 chủng VKTQH có khả năng sinh lipase, trong đó 4 chủng có đường kính vòng phân giải > 9 mm ký hiệu là: NT50, NT75, PY19, ND33.
- Trong số 61 chủng VKTQH, tỷ lệ sinh protease cao nhất (chiếm 47,54%). Tiếp đến là sinh tổng hợp gelatinase (chiếm 36,07%); amylase (chiếm 32,79%) và lipase (chiếm 18,03%) và thấp nhất là khả năng sinh tổng hợp cellulase (chiếm 24,59%).

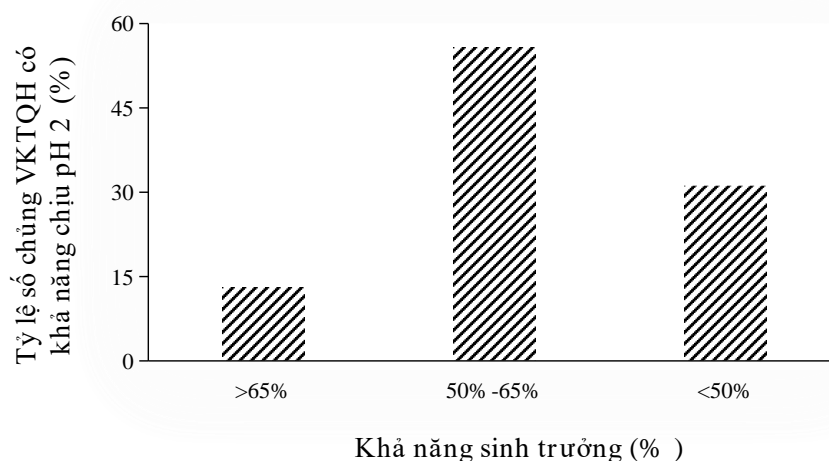
Chumpol và cộng sự (2017) đã nghiên cứu khả năng sinh enzyme: gelatinase, amylase, lipase của các chủng VKTQH phân lập từ ao nuôi tôm. Từ 185 chủng VKTQH phân lập đã sàng lọc được 6 chủng có khả năng sinh enzyme. Trong đó, cả 6 chủng đều có khả năng sinh gelatinase với đường kính vòng phân giải từ 9,93 mm - 34,33 mm, 2 chủng có khả năng sinh amylase với đường kính vòng phân giải từ 22,23 mm - 26,80 mm, 2 chủng có khả năng sinh lipase với đường kính vòng phân giải 6,83 mm - 11,94 mm [29].

3.2.4. Sàng lọc các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng sinh trưởng ở pH thấp và chịu muối mật

3.2.4.1. Khả năng sinh trưởng ở pH thấp của các chủng vi khuẩn tía quang hợp

Hệ tiêu hóa của TTCT có pH dạ dày trung tính dao động khoảng pH 7, thích hợp cho VSV sinh trưởng và phát triển [59] bao gồm cả VKTQH. Tuy nhiên, một trong những tiêu chí để lựa chọn VSV làm probiotic là các chủng VSV này có khả năng chịu được pH thấp của dạ dày để xâm nhập và tồn tại trong hệ tiêu hóa của vật nuôi. Với mục đích không chỉ sử dụng các chủng VKTQH lựa chọn làm probiotic trong nuôi TTCT mà còn có thể ứng dụng cho các đối tượng khác nhau trong NTTS nên khả năng sinh trưởng của VKTQH trong dịch dạ dày mô phỏng ở pH thấp được tiến hành xác định.

Theo Fang và cộng sự (2012), pH 2 là giá trị tới hạn để tiến hành sàng lọc các chủng VK có khả năng chịu pH thấp trong môi trường dạ dày [34]. Vì vậy, khả năng sinh trưởng ở pH 2 trên môi trường dịch dạ dày mô phỏng trong 180 phút của 61 chủng VKTQH nghiên cứu được xác định và kết quả được trình bày ở Hình 3.4.



Hình 3.4. Khả năng sinh trưởng trên môi trường dịch dạ dày mô phỏng (pH = 2) trong 180 phút của các chủng VKTQH nghiên cứu

Từ Hình 3.4 cho thấy sau 180 phút, trong số 61 chủng VKTQH nghiên cứu có 9 chủng (chiếm 14,75%) có khả năng sinh trưởng trên 65%; 34 chủng (chiếm 55,74%) có khả năng sinh trưởng từ 50%-65% và 18 chủng (chiếm 29,51%) có khả năng sinh trưởng từ 30%-50% so với thời điểm ban đầu (0 giờ).

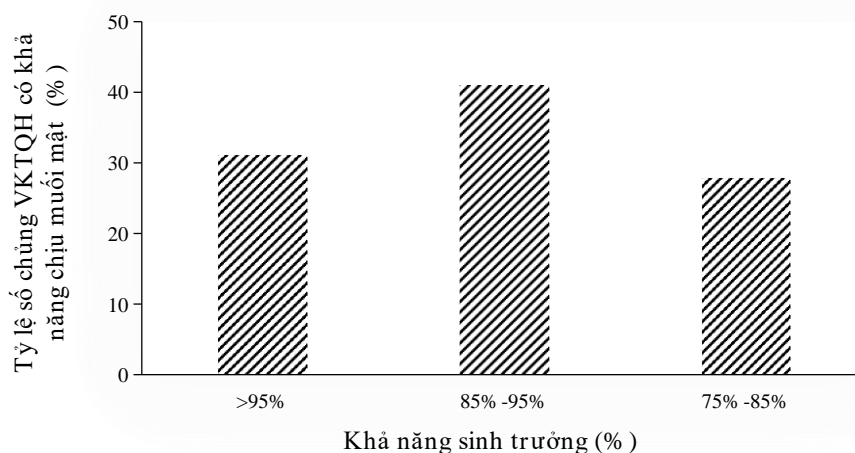
Như vậy, cả 61 chủng VKTQH đều có khả năng sinh trưởng trên 30% trong môi trường dạ dày mô phỏng pH 2. Vì vậy, 61 chủng VKTQH này được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.4.2. Khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn tía quang hợp

Theo Gilliland và cộng sự (1984), nồng độ muối mật 0,3% là giá trị tới hạn để sàng lọc các chủng VK kháng muối mật. Nồng độ này đủ cao để ức chế sự sinh trưởng của nhiều VSV, cho phép đánh giá khả năng chịu đựng của các chủng VK probiotic tiềm năng trong môi trường ruột non chứa muối mật [60]. Việc sử dụng nồng độ muối mật 0,3% giúp sàng lọc những chủng VK có khả năng chống chịu tốt trong môi trường muối mật, từ đó tăng khả năng tồn tại và hoạt động hiệu quả của các chủng probiotic trong đường ruột của vật chủ .

Để tiến hành xác định khả năng chịu muối mật của 61 chủng VKTQH, các chủng này được nuôi cấy trong môi trường ruột non mô phỏng có bổ sung nồng độ muối mật 0,3% trong 240 phút, kết quả được trình bày ở Hình 3.5.

Từ Hình 3.5 cho thấy, trong số 61 chủng VKTQH có 23 chủng (chiếm 37,70%) khả năng sinh trưởng cao > 95%; có 26 chủng (chiếm 42,62%) có khả năng sinh trưởng từ 85%- 95% và 12 chủng (chiếm 19,67%) có khả năng sinh trưởng từ 75% - 85%.



Hình 3.5. Khả năng chịu muối mật của các chủng VKTQH nghiên cứu

Như vậy, 61 chủng VKTQH có khả năng sinh trưởng > 75% trong môi trường dịch non mô phỏng chứa 0,3% muối mật sau 240 phút được lựa chọn để xác định khả năng bám dính của các chủng VKTQH.

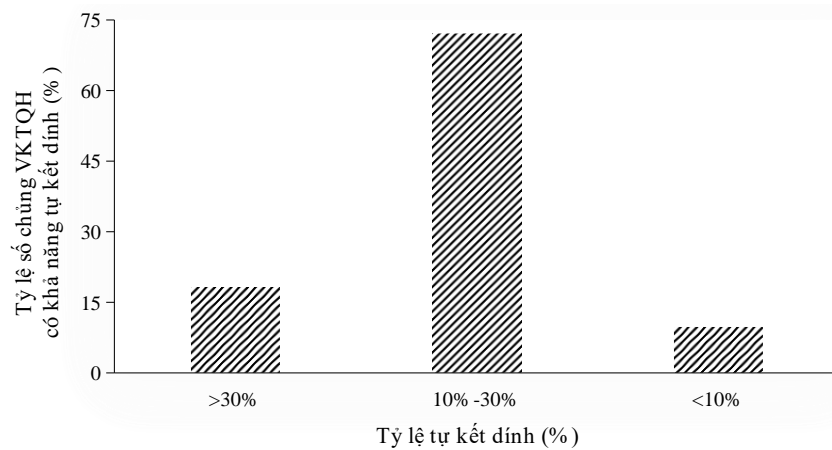
3.2.5. Khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn tía quang hợp

Theo Đỗ Thị Bích Thủy và Nguyễn Thị Diễm Hương (2018), khả năng bám dính của các chủng VSV làm probiotic được đánh giá dựa trên 3 tiêu chí: đồng kết dính, tự kết dính và bám dính với đường ruột của vật chủ [53]. Tuy nhiên, gần đây một số tác giả đã sử dụng khả năng tạo màng biofilm để xác định khả năng bám dính của các chủng VSV làm probiotic [61]. Do đó, khả năng bám dính của 61 chủng VKTQH nghiên cứu được xác định dựa trên 2 tiêu chí: tự kết dính và tạo màng biofilm.

3.2.5.1. Khả năng tự kết dính của các chủng vi khuẩn tía quang hợp

Tỷ lệ tự kết dính của VSV được đánh giá qua sự giảm mật độ VK trong dung dịch theo thời gian do các VSV bám dính vào nhau, tạo thành các cụm và lắng xuống trong dung dịch. Để xác định khả năng tự kết dính của 61 chủng VKTQH, các chủng này được đo mật độ tế bào (OD_{660}) lớp dịch phía trên ở các thời điểm 0 giờ và sau 5 giờ. Kết quả xác định khả năng tự kết dính của các chủng VKTQH được trình bày ở Hình 3.6.

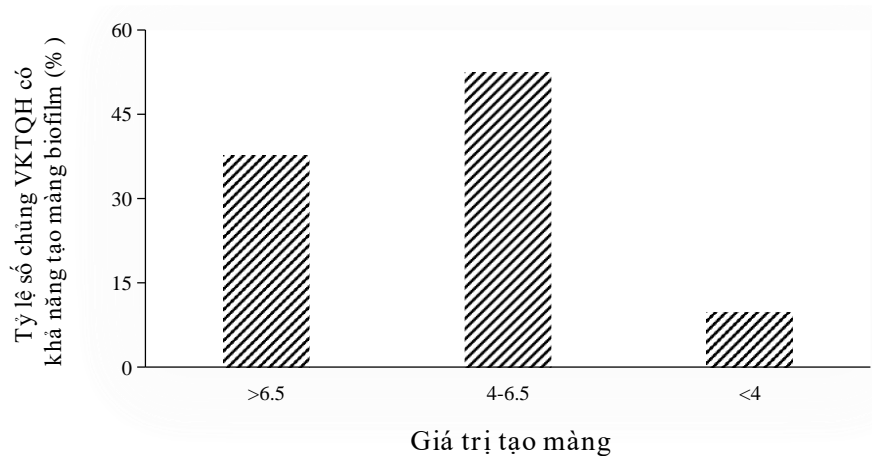
Từ Hình 3.6 cho thấy trong số 61 chủng VKTQH có 11 chủng (chiếm 18,03%) có khả năng tự kết dính với tỷ lệ kết dính > 30%; 44 chủng (chiếm 72,13%) có khả năng tự kết dính với tỷ lệ kết dính dao động từ 10% - 30% và 6 chủng (chiếm 9,84%) có khả năng tự kết dính kém nhất với tỷ lệ kết dính < 10%.



Hình 3.6. Khả năng tự kết dính của các chủng VKTQH nghiên cứu

3.2.5.2. Khả năng tạo màng biofilm của các chủng vi khuẩn tía quang hợp

Khả năng tạo màng biofilm của các chủng VKTQH được tiến hành theo phương pháp nhuộm tím tinh thể. Giá trị tạo màng được tính dựa trên OD₅₇₀ đo lường tím tinh thể liên kết với các tế bào trên màng sinh học, do đó biểu thị mật độ tế bào sống có trên màng sinh học. Vì vậy, chỉ số OD₅₇₀ càng cao, mật độ VK trên màng sinh học càng lớn, khả năng tạo màng biofilm càng mạnh và ngược lại. Kết quả xác định khả năng tạo màng biofilm của các chủng VKTQH được trình bày ở Hình 3.7.



Hình 3.7. Khả năng tạo biofilm của các chủng VKTQH nghiên cứu

Từ Hình 3.7 cho thấy trong số 61 chủng nghiên cứu có: 23 chủng (chiếm 37,70%) có giá trị tạo màng > 6,5; 32 chủng (chiếm 52,46%) có giá trị tạo màng từ 4 - 6,5 và 6 chủng (chiếm 9,84%) có giá trị tạo màng < 4.

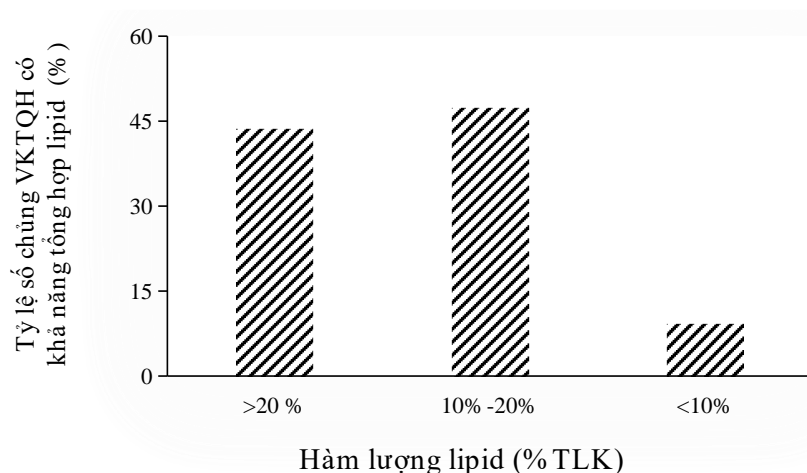
Như vậy, trong 61 chủng VKTQH nghiên cứu có 55 chủng vừa có khả năng tự kết dính cao (> 10%) và vừa có khả năng tạo màng biofilm cao (giá trị tạo màng > 4). Do đó, 55 chủng VKTQH được tuyển chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP CÓ THÀNH PHẦN DINH DƯỠNG CAO (LIPID VÀ PUFA)

Lipid và PuFa là những thành phần dinh dưỡng quan trọng trong khẩu phần ăn tôm, tác động đến quá trình tiêu hóa và phát triển của tôm. Nhu cầu về lipid và các acid béo cụ thể (MUFA và PUFA) thay đổi trong suốt quá trình phát triển của ấu trùng tôm. Theo các nghiên cứu trước đây, PUFA nên chiếm khoảng 1-2% trong thành phần thức ăn của động vật thủy sản [62]. Chính vì vậy, khả năng sinh tổng hợp lipid và PUFA cao của 55 chủng VKTQH có hoạt tính probiotic được xác định.

3.3.1. Khả năng tổng hợp lipid của các chủng vi khuẩn tia quang hợp

Để xác định hàm lượng lipid của VKTQH, các chủng này được nuôi cấy trong môi trường BTH ở điều kiện kỵ khí - sáng, nhiệt độ 30-32°C. Sau 4 ngày, thu sinh khối bằng chitosan ở nồng độ 150 mg/L, sấy khô sinh khối ở 70°C đến khối lượng không đổi để tiến hành tách chiết lipid. Kết quả xác định hàm lượng lipid của các chủng VKTQH được trình bày ở Hình 3.8.



Hình 3.8. Khả năng tổng hợp lipid của các chủng VKTQH nghiên cứu

Từ Hình 3.8 cho thấy trong số 55 chủng VKTQH có 24 chủng có hàm lượng lipid cao trên 20% TLK (chiếm 43,64%); có 26 chủng có khả năng tổng hợp lipid từ 10%-20% TLK (chiếm 47,27%) và 5 chủng có khả năng tổng hợp lipid <10% (chiếm 9,09%).

Như vậy, từ 55 chủng VKTQH đã lựa chọn được 24 chủng có khả năng tổng hợp lipid cao trên 20% TLK. Tuy nhiên, dựa vào các tiêu chí lựa chọn chủng sử dụng làm probiotic như: khả năng kháng khuẩn, sinh enzyme, sinh trưởng ở pH thấp và muối mật, khả năng bám dính, lipid... đã lựa chọn 20 chủng vừa có đặc tính probiotic vừa có hàm lượng lipid trên 20% TLK để tiến hành xác định thành phần PUFA bằng phương pháp GC-MS.

3.3.2. Khả năng tổng hợp PUFA của các chủng vi khuẩn tía quang hợp

Sau khi lựa chọn được 20 chủng VKTQH có tỷ lệ sinh lipid cao > 20% TLK, thành phần và hàm lượng PUFA của các chủng VKTQH được xác định và kết quả được trình bày ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6 . Hàm lượng PUFA của các chủng VKTQH tuyển chọn

STT	Tên chủng	Hàm lượng PUFA (% TFA)
1	HP10	33,64±3,78
2	HP11	51,43±0,05
3	ND42	42,38±2,71
4	NT1	50,73±1,36
5	NT40	12,44±0,45
6	NT50	52,15±0,94
7	NT52	4,66±0,85
8	NT64	5,74±0,08
9	NT67	31,83±1,99
10	NT69	51,26±0,42
11	PY20	40,94±2,89
12	PY35	35,80±1,53
13	ST15	35,37±0,08
14	ST20	39,90±0,35
15	ST87	44,52±2,77
16	BL102	42,26±0,64
17	BL40	24,19±1,69
18	BL84	50,36±0,89
19	BL98	13,97±0,37
20	BN8	31,03±0,22

Kết quả từ Bảng 3.6 cho thấy trong số 20 chủng VKTQH phân tích có 15 chủng có hàm lượng PUFA > 30% TFA.

Như vậy, từ 55 chủng VKTQH có hoạt tính probiotic sàng lọc được 15 chủng có hàm lượng PUFA > 30% TFA.

Tổng hợp các đặc tính probiotic bao gồm các khả năng: đối kháng *Vibrio*, sinh enzyme tiêu hóa, chịu acid, chịu muối mật, tự kết dính, tạo màng biofilm và thành phần dinh dưỡng (lipid và PUFA) của 15 chủng VKTQH này được trình bày ở Bảng 3.7.

Từ Bảng 3.7 cho thấy, trong số 15 chủng VKTQH có 8 chủng có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* BLV10 gây bệnh AHPND đó là các chủng: HP10, HP11, ND42, NT67, NT69, PY35, ST20, BN8. Trong số 8 chủng VKTQH

này, có 5 chủng vừa có khả năng đối kháng và có khả năng sinh tổng hợp đồng thời enzyme tiêu hóa ký hiệu là: HP10, ND42, PY35, ST20, BN8.

Để lựa chọn các VSV làm probiotic trong nuôi TTCT nói riêng và NTTS nói chung thì khả năng đối kháng với VK gây bệnh là một trong các chỉ tiêu quan trọng nhất giúp tăng khả năng phòng trừ bệnh. Tiêu chí quan trọng tiếp theo là các chủng probiotic phải có khả năng sinh tổng hợp nhiều enzyme để kích thích hệ tiêu hóa cho tôm. Như vậy, trong 15 chủng VKTQH lựa chọn được 5 chủng vừa có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND, vừa sinh tổng hợp đồng thời enzyme tiêu hóa ký hiệu là: HP10, ND42, PY35, ST20, BN8. Trong khuôn khổ nghiên cứu đề tài này, 3 chủng VKTQH ký hiệu ND42, ST20 và BN8 được lựa chọn để nghiên cứu một số đặc điểm sinh học cơ bản và tiến hành định danh.

Bảng 3.7. Tổng hợp các đặc điểm chính của 15 chủng VKTQH có có hàm lượng PUFA cao

ST T	Tên chủng	Khả năng đối kháng (mm)		Khả năng sinh enzyme (mm)					Tỷ lệ sinh trưởng của VKTQH trên môi trường (%)		Khả năng bám dính		Hàm lượng dinh dưỡng	
		<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	Gelatinase	Protease	Amylase	Cellulase	Lipase	pH 2	Muối mật	Tỷ lệ kết dính (%)	Giá trị tạo màng biofilm	Lipid (% TLK)	PUFA (% TFA)
1	HP10	10,31±0,77	8,01±0,72	-	6,87±0,94	5,47±0,87	-	-	55,43±0,47	97,77±0,47	45,00±1,29	8,17±0,32	24,80±0,75	33,64±3,78
2	HP11	5,29±0,23	-	-	5,85±0,72	-	3,89±1,24	-	68,99±0,73	86,92±0,34	47,41±1,25	8,47±0,39	25,96±0,40	51,43±0,05
3	ND42	14,66±0,31	-	3,38±0,64	5,23±1,40	-	-	-	51,92±1,37	93,02±0,46	22,80±0,32	5,65±0,82	26,87±0,88	42,38±2,71
4	NT1	-	4,05±1,39	-	10,26±1,74	-	5,68±1,55	-	43,17±1,12	90,01±0,18	26,63±0,99	6,21±0,21	26,30±0,83	50,73±1,36
5	NT50	-	8,13±1,76	-	-	-	-	9,81±0,85	57,67±0,99	97,82±0,43	27,82±1,27	6,57±0,27	25,09±0,37	52,15±0,94
6	NT67	5,28±0,85	4,93±0,81	-	3,55±1,05	-	-	-	54,25±1,56	80,92±0,21	23,64±0,54	5,78±0,88	23,83±0,86	31,83±1,99
7	NT69	4,05±1,01	-	5,34±1,06	-	12,27±1,31	-	-	41,32±1,29	96,63±0,32	26,61±1,39	6,28±0,13	23,86±0,62	51,26±0,42
8	PY20	-	9,15±1,11	7,45±1,48	6,99±0,94	4,23±0,51	-	-	56,21±1,47	91,51±0,28	26,89±1,15	6,31±0,90	25,80±0,46	40,94±2,89
9	PY35	9,95±1,54	8,56±1,05	-	-	6,67±0,73	-	-	55,9±1,10	95,86±0,49	24,89±0,45	5,74±0,62	23,19±0,22	35,80±1,53
10	ST15	-	5,49±0,94	-	5,45±0,86	-	-	-	57,35±1,35	97,60±0,25	28,52±0,37	6,58±0,75	25,22±0,90	35,37±0,08
11	ST20	10,89±1,04	5,95±1,10	-	11,12±1,22	4,08±0,32	-	7,39±0,85	65,64±1,12	97,38±0,25	40,60±1,52	7,67±0,01	25,96±0,89	39,90±0,35
12	ST87	-	4,16±1,77	6,06±0,70	-	-	-	-	39,85±0,98	94,49±0,23	28,29±1,31	6,62±0,51	22,04±0,32	44,52±2,77
13	BL102	-	8,38±1,35	-	-	5,06±1,34	-	-	44,06±0,85	97,78±0,36	27,67±0,96	6,59±0,21	24,46±0,48	42,26±0,64
14	BL84	-	8,76±1,85	9,85±0,85	-	-	-	-	38,69±1,28	91,50±0,26	28,82±1,37	6,88±0,51	21,33±1,19	50,36±0,89
15	BN8	6,25±1,1	4,52±0,78	-	-	9,25±1,27	10,51±1,44	7,19±0,97	56,46±1,58	85,80±0,45	28,40±0,98	6,76±0,18	25,95±0,66	31,03±0,22

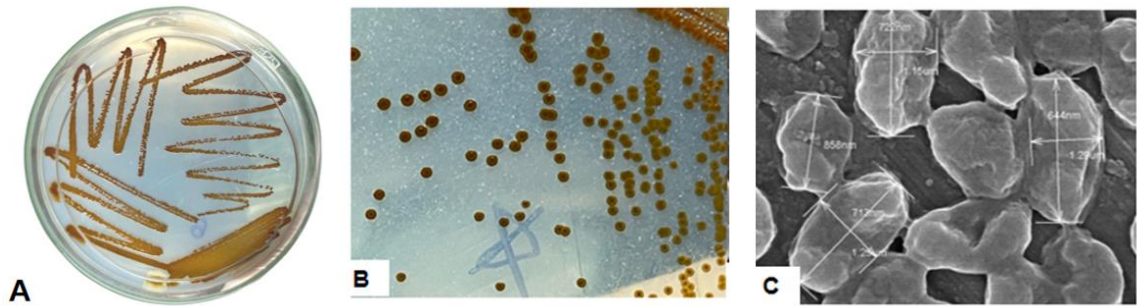
Ghi chú: (-) Không có khả năng đối kháng; không có khả năng sinh enzyme tiêu hóa.

3.4. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CƠ BẢN VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP TUYỂN CHỌN

3.4.1. Đặc điểm sinh học cơ bản của các chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn

3.4.1.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào

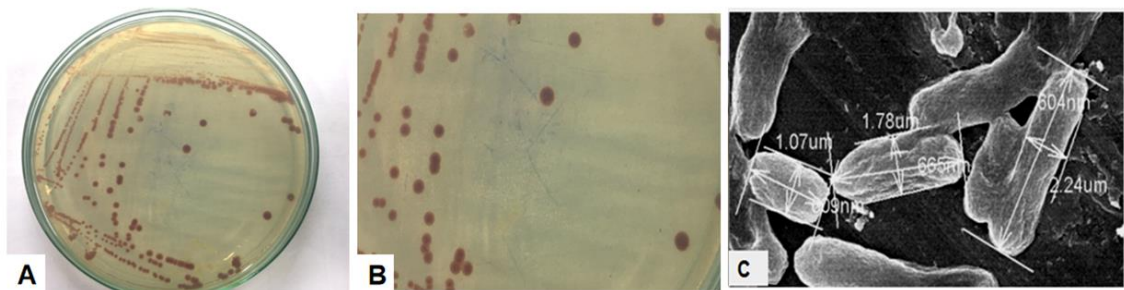
Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 3 chủng VKTQH tuyển chọn: ND42, ST20, BN8 được xác định bằng cách ria cấy các chủng trên môi trường DSMZ-27, ở điều kiện kỵ khí sáng, cường độ chiếu sáng khoảng 5.000 lux, nhiệt độ khoảng 30-32°C trong 7 ngày. Hình dạng tế bào của các chủng VKTQH tuyển chọn được quan sát trên kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 20.000 lần. Kết quả được trình bày Hình 3.9; Hình 3.10; Hình 3.11.



Hình 3.9. Hình dạng, kích thước khuẩn lạc và tế bào của chủng ND42

Ghi chú: A, B: Hình dạng khuẩn lạc; C: Hình dạng tế bào trên kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 20.000 lần

Kết quả Hình 3.9 (A, B) cho thấy, khuẩn lạc của chủng ND42 có dạng hình tròn, lồi, mép căng, màu nâu vàng, bề mặt bóng, đường kính khoảng 1,8 - 2 mm, dịch huyền phù có màu nâu vàng. Tế bào (Hình 3.9C) có dạng hình trứng, kích thước khoảng 0,64 - 1,29 μm , sinh sản bằng cách nhân đôi, tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào.

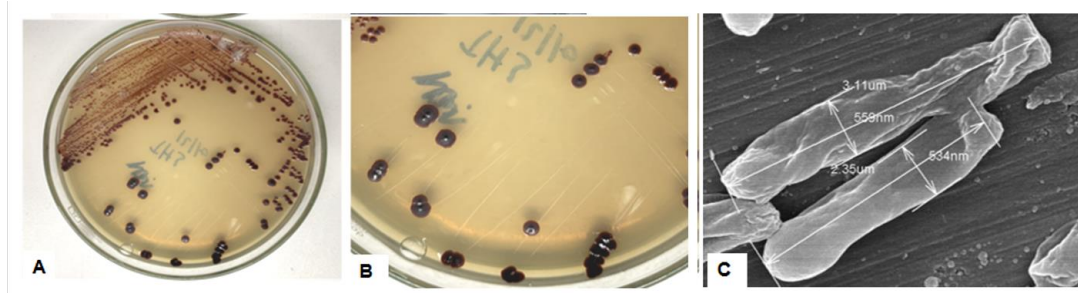


Hình 3.10. Hình dạng, kích thước khuẩn lạc và tế bào của chủng ST20

Ghi chú: A, B: Hình dạng khuẩn lạc; C: Hình dạng tế bào trên kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 20.000 lần

Kết quả từ Hình 3.10 (A, B) cho thấy, khuẩn lạc của chủng ST20 có dạng hình tròn, lồi, màu đỏ nâu, đường kính khoảng 1,4 - 1,6 mm. Dịch huyền phù có màu đỏ nâu. Tế bào (Hình 3.10 C) có dạng hình trứng, đường kính khoảng 0,66 -

1,07 μm , sinh sản bằng cách nhân đôi, tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào.



Hình 3.11. Hình dạng, kích thước khuẩn lạc và tế bào của chủng BN8

Ghi chú: A, B: Hình dạng khuẩn lạc; C: Hình dạng tế bào trên kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 20.000 lần

Kết quả từ Hình 3.11 (A, B) cho thấy, khuẩn lạc của chủng BN8 có dạng hình tròn, lõi có nhân ở giữa, màu đỏ đậm, đường kính khoảng 2,5-2,9 mm. Dịch huyền phù có màu đỏ đậm. Tế bào (Hình 3.11C) có dạng hình que, kích thước khoảng 0,54-2,35 μm , sinh sản bằng nảy chồi, tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào.

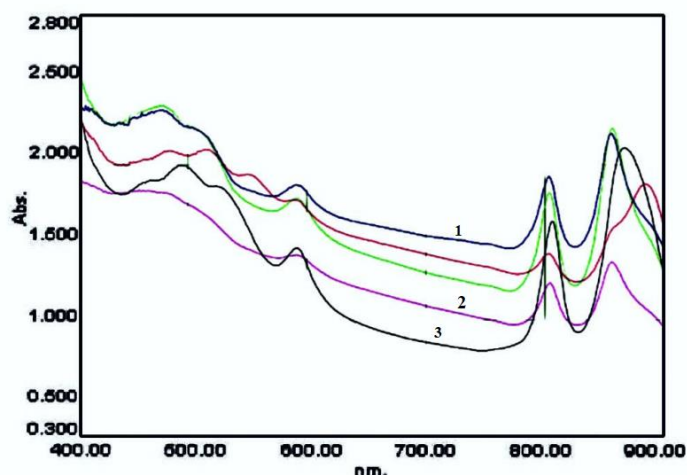
Như vậy, dựa vào hình dạng tế bào và phương thức sinh sản, 2 chủng ký hiệu ND42, ST20 có thể thuộc các chi *Rhodobacter*, *Rhodobaca* hoặc *Rhodovulum*. Chủng ký hiệu BN8 có thể thuộc chi *Rhodopseudomonas*, *Rhodoplanes* hoặc *Rhodobium*.

3.4.1.2. Đặc điểm hệ sắc tố quang hợp

Khả năng tổng hợp các loại *Bchl* khi được chiếu sáng là một trong những đặc trưng cơ bản để phân biệt VKTQH với các nhóm VSV quang dưỡng khác. Các chủng VKTQH được nuôi cấy trên môi trường GA lỏng, ở điều kiện vi hiếu khí - sáng, nhiệt độ khoảng 30-32°C, trong 4 ngày. Phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào của 3 chủng VKTQH: ND42, ST20, BN8 được đo ở bước sóng từ 400-900 nm. Kết quả được trình bày ở Hình 3.12.

Từ Hình 3.12 cho thấy cực đại hấp thụ dịch huyền phù tế bào của chủng ND42 có các cực đại hấp thụ tại 804 và 856 nm; Chủng ST20 có các cực đại hấp thụ tại 803 và 884 nm; Chủng BN8 có các cực đại hấp thụ tại 804 và 857 nm.

Như vậy, cực đại hấp thụ của 3 chủng VKTQH đều có đỉnh tại bước sóng 800-900 nm (Hình 3.12). Đây là vùng hấp thụ đặc trưng của *Bchl a*, sắc tố quang hợp chính của VKTQH. Vì vậy, cả 3 chủng VKQHT tuyển chọn đều chứa *Bchl a*.



Hình 3.12. Phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào của 3 chủng VKTQH: BN8 (1); ST20 (2), ND42 (3)

3.4.1.3. Đặc điểm dinh dưỡng carbon và nitrogen

Khả năng sử dụng carbon và nitrogen của 3 chủng VKTQH tuyển chọn: ND42, PY35, ST20, BN8 được xác định bằng cách nuôi cấy các chủng trên môi trường GA, bổ sung các nguồn carbon và nitrogen khác nhau, ở điều kiện vi hiếu khí - sáng, nhiệt độ khoảng 30-32°C, trong 4 ngày. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của 3 chủng VKTQH trên môi trường chứa các nguồn carbon và nitrogen khác nhau được trình bày ở Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH nghiên cứu trên các nguồn carbon và nitrogen khác nhau

Nguồn carbon	Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH lựa chọn		
	ND42	ST20	BN8
Acetate	+	+	+
Benzoate	-	-	+
Citrate	-	-	+
Ethanol	+	+	-
Formate	-	+	-
Fructose	-	-	+
Glucose	+	+	+
Glycerol	+	+	+
Malate	+	+	+
Peptone	+	+	+
Propanol	+	+	-
Propionate	+	+	+
Pyruvate	+	+	+
Succinate	+	+	+
Nguồn nitrogen			
Cao nấm men	+	+	+

Glutamate	+	+	+
NH ₄ Cl	+	+	+
Urea	-	-	+

Ghi chú: (-): $\Delta OD_{660} < 0,1$: không sinh trưởng; (+): $\Delta OD_{660} > 0,1$: có khả năng sinh trưởng

Từ Bảng 3.8 cho thấy 3 chủng VKTQH lựa chọn đều có khả năng sử dụng nhiều nguồn carbon và nitrogen khác nhau cho sinh trưởng.

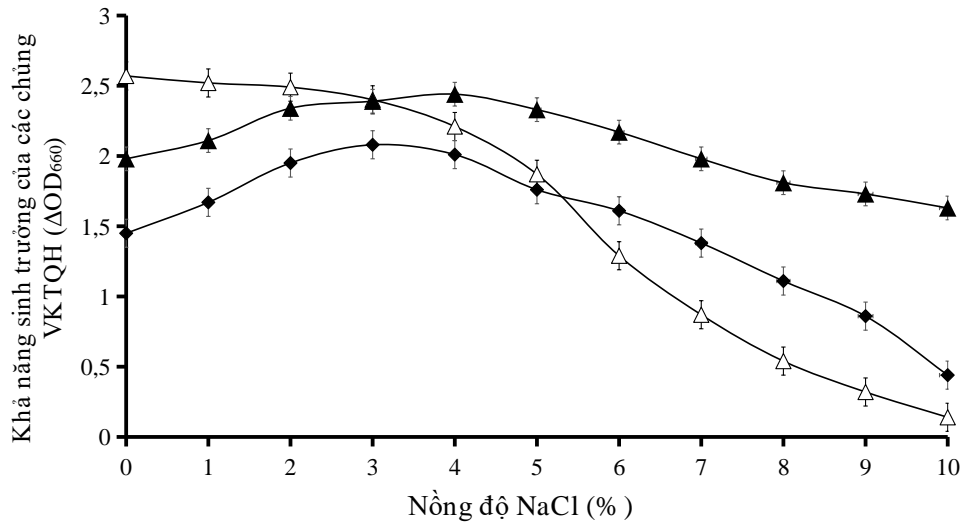
Về khả năng sử dụng nguồn carbon: tất cả các chủng đều có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa các nguồn carbon: acetate; glucose; glutamate; glycerol; malate; peptone; propionate; pyruvate; succinate. Trong 3 chủng VKTQH, chỉ có chủng BN8 có khả năng sử dụng benzoate, fructose và citrate để sinh trưởng. Chủng ND42 có khả năng sử dụng ethanol; chủng ST20 có khả năng sử dụng formate; 2 chủng (ND42, ST20) có khả năng sử dụng propanol.

Về khả năng sử dụng nguồn nitrogen: Tất cả các chủng đều có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa: cao nấm men; glutamate; NH₄Cl. Trong 3 chủng VKTQH, chỉ có chủng BN8 có khả năng sử dụng urea.

Như vậy, 3 chủng VKTQH tuyển chọn đều có khả năng sử dụng nhiều nguồn carbon và nitrogen cho sinh trưởng. Đây là một trong những đặc điểm của nhóm VKTQH, giúp chúng có khả năng tồn tại ở nhiều loại môi trường trong các điều kiện khác nhau [19].

3.4.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ muối (NaCl) đến sinh trưởng của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn

Khả năng chịu mặn là một trong những tiêu chí để phân loại VKTQH và sử dụng trong sản xuất sinh khối ở quy mô pilot. Khả năng chịu muối của 3 chủng VKTQH tuyển chọn: ND42, ST20, BN8 được xác định bằng cách nuôi cấy các chủng trên môi trường GA, bổ sung nồng độ NaCl theo tỷ lệ từ 0% - 10%. Sau 4 ngày nuôi cấy, ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng của 3 chủng VKTQH được xác định. Kết quả trình bày ở Hình 3.13.



Hình 3.13. Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH: ND42 (Δ), ST20 (◆), BN8 (▲) ở các nồng độ NaCl khác nhau

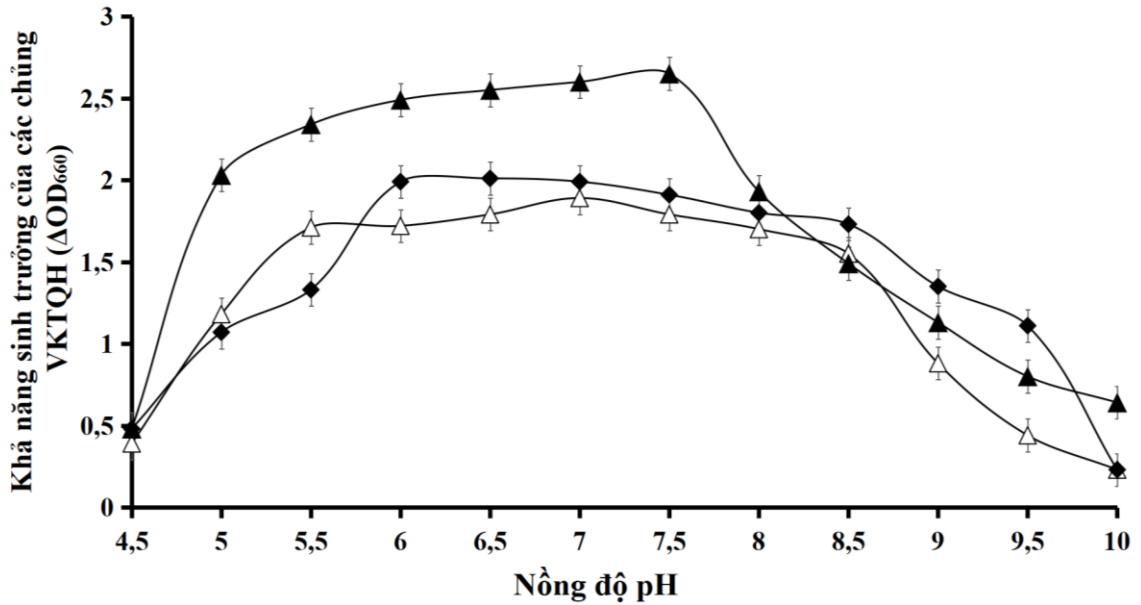
Từ Hình 3.13 cho thấy, cả 3 chủng đều có khả năng sinh trưởng ở nồng độ muối khá rộng. Chủng ND42 có khả năng sinh trưởng ở nồng độ NaCl từ 0-6% (tối ưu ở 3%). Chủng ST20 có khả năng sinh trưởng ở nồng độ NaCl từ 1-8% (tối ưu ở 3%). Chủng BN8 có khả năng sinh trưởng ở nồng độ NaCl từ 0-5% (tối ưu ở 0%).

Từ các kết quả nêu trên và theo hệ thống phân loại của Bergey (2005) [17] cho thấy chủng ST20 có thể thuộc chi *Rhodovulum*, chủng ND42 có thể thuộc chi *Rhodobacter* hoặc *Rhodobium*, chủng BN8 có thể thuộc chi *Rhodopseudomonas*.

3.4.1.5. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn

Khả năng sinh trưởng của 3 chủng VKTQH ở các nồng độ pH khác nhau được xác định bằng cách nuôi cấy các chủng trên môi trường GA lỏng, pH được điều chỉnh trong khoảng từ 4,5 đến 10. Kết quả sau 4 ngày nuôi cấy, ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của 3 chủng VKTQH tuyển chọn được đánh giá dựa trên ΔOD_{660} , kết quả trình bày Hình 3.14.

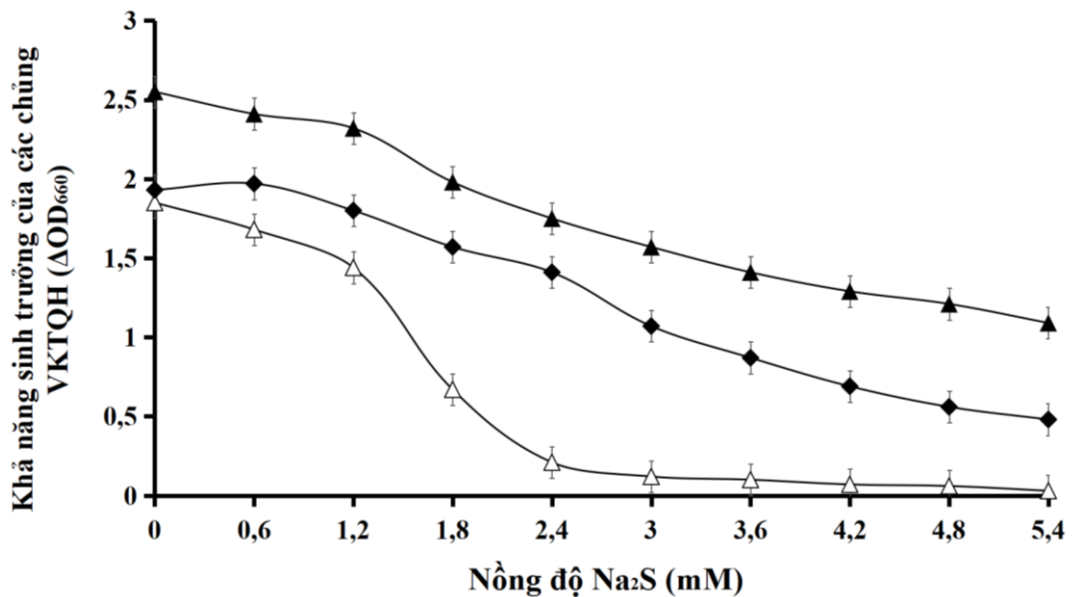
Từ Hình 3.14 cho thấy, cả 3 chủng VKTQH nghiên cứu đều có khả năng sinh trưởng tốt ở dải pH rộng. Trong đó, chủng ND42 có khả năng sinh trưởng ở dải pH từ 5,5-8,5 (tối ưu ở pH 7). Chủng PY35 có khả năng sinh trưởng ở dải pH từ 5,0-8,0 (tối ưu ở pH 7). Chủng ST20 có khả năng sinh trưởng ở dải pH từ 5,5-9,5 (tối ưu ở pH 6,5). Chủng BN8 có khả năng sinh trưởng ở dải pH từ 6-8,5 (tối ưu ở pH 7,5).



Hình 3.14. Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH: ND42 (Δ), ST20 (◆), BN8 (▲) ở các nồng độ pH khác nhau

3.4.1.6. Khả năng chịu sulfide của 3 chủng chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn

Khả năng chịu sulfide của 3 chủng VKTQH lựa chọn được xác định bằng cách nuôi cấy các chủng VKTQH trên môi trường GA lỏng, bổ sung Na₂S ở các nồng độ khác nhau (từ 0 đến 5,4 mM) trong 4 ngày. Kết quả xác định khả năng sử dụng Na₂S của 3 chủng VKTQH tuyển chọn được trình bày ở Hình 3.15.



Hình 3.15. Sinh trưởng của 3 chủng VKTQH: ND42 (Δ), ST20 (◆), BN8 (▲) ở các nồng độ Na₂S khác nhau

Từ Hình 3.15 cho thấy, 2 chủng VKTQH: ST20 và BN8 có khả năng chịu

nồng độ Na_2S đến 5,4 mM. Chủng ND42 chỉ có khả năng chịu nồng độ Na_2S đến 2,4 mM. Ngoài ra, sinh trưởng của chủng ST20 ở nồng độ Na_2S 0,6 mM đều cao hơn so với môi trường không chứa Na_2S . Do vậy, chủng ST20 cần sulfide cho sinh trưởng nên có khả năng chủng này thuộc loài *Rhv. sulfidophilum*.

Từ các đặc điểm về hình thái và sinh lý, sinh hoá nêu trên của 3 chủng VKTQH, cho thấy chủng ST20 có nhiều đặc điểm giống các loài thuộc chi *Rhodovulum*. Chủng ND42 có nhiều đặc điểm giống các loài thuộc chi *Rhodobacter*. Chủng BN8 có nhiều đặc điểm giống các loài thuộc chi *Rhodopseudomonas*. Các đặc điểm về hình thái, sinh lý sinh hóa của 3 chủng VKTQH lựa chọn được so sánh với các loài đã công bố và kết quả được trình bày ở Bảng 3.9 và Bảng 3.10.

Từ Bảng 3.9 cho thấy chủng ST20 có thể thuộc loài *Rhv. sulfidophilum* vì tế bào có dạng hình cầu và hình trứng, sinh sản theo phương thức nhân đôi, sinh trưởng ở nồng độ NaCl cao và đặc biệt cần sulfide cho sinh trưởng, đặc trưng của loài *Rhv. sulfidophilum*. Chủng ND42 có thể thuộc loài *Rba. sphaeroides* vì tế bào có hình trứng, có khả năng chịu được NaCl cao và khả năng chịu sulfide < 2,4 mM.

Từ Bảng 3.10 cho thấy chủng chủng BN8 có thể thuộc loài *Rps. palustris* vì tế bào có dạng hình que, sinh sản theo phương thức nảy chồi, không chịu được NaCl cao và có khả năng sử dụng benzoate đặc trưng của loài *Rps. palustris*.

Như vậy, từ các đặc điểm về hình thái và sinh lý, sinh hoá nêu trên cho thấy chủng ST20 có đặc điểm giống loài *Rhv. sulfidophilum*, chủng ND42 có đặc điểm giống loài *Rba. sphaeroides*, chủng BN8 có đặc điểm giống loài *Rps. Palustris*. Tuy nhiên, để đưa ra kết luận chính xác hơn, phân tích trình tự gene 16S rRNA của 3 chủng nghiên cứu được tiến hành trong các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 3.9. So sánh một số đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa chính của các chủng VKTQH tuyển chọn với một số loài trong chi *Rhodovulum* và *Rhodobacter*

Đặc điểm	Các loài thuộc chi <i>Rhodovulum</i>		Các loài thuộc chi <i>Rhodobacter</i>		Các chủng VKTQH lựa chọn	
	<i>Rhv. strictum</i> [62]	<i>Rhv. sulfidophilum</i> [46]	<i>Rba. capsulatus</i> [63]	<i>Rba. sphaeroides</i> [46]	ST20	ND42
Màu sắc khuẩn lạc	Màu đỏ	Màu nâu	Màu đỏ	Màu nâu vàng	Màu đỏ nâu	Màu nâu vàng
Hình dạng tế bào	Hình cầu	Hình trứng, hình cầu	Hình cầu	Hình cầu, hình trứng	Hình trứng	Hình trứng
Hình thức sinh sản	Nhân đôi	Nhân đôi	Nhân đôi	Nhân đôi	Nhân đôi	Nhân đôi
Kích thước tế bào (μm)	0,6-1,0	0,6-0,9	0,5-1,2	2-2,5	0,66-1,07	0,64-1,29
Phổ hấp thụ (nm)	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>
Nhu cầu NaCl cho sinh trưởng (%)	0,5-3	1-9	0-4	0-4	1-8 (3)	0-6 (3)
pH (tối ưu)	8-9 (8,5)	6,5-9 (7,5)	7-8,5 (7)	6,0-8,5 (7)	5,5-9,5 (6,5)	5,5-8,5 (7)
Khả năng chịu sulfide (mM)	KXĐ	5,2-8,0	KXĐ	KXĐ	0,6-5,4	<2,4
Khả năng sử dụng carbon						
Citrate	+	-	+/-	+/-	-	-
Ethanol	-	+/-	+	+	+	+
Formate	+	+	+	-	+	-
Fructose	+	-	+	+	-	-
Glutamate	-	+	+	+/-	+	+
Glycerol	-	+	+	+	+	+
Propionate	+	+	-	+	+	+
Khả năng sử dụng nitrogen						
Glutamate	-	+	+	+	+	+
Urea	-	-	+	+	-	+

Ghi chú: (+) có khả năng sinh trưởng; (-): không có khả năng sinh trưởng; KXĐ: Không xác định.

Bảng 3.10. So sánh một số đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa chính của các chủng VKTQH tuyển chọn với một số loài trong chi *Rhodopseudomonas* và *Rhodobium*

Đặc điểm	Các loài thuộc chi <i>Rhodopseudomonas</i>		Các loài thuộc chi <i>Rhodobium</i>		Các chủng VKTQH lựa chọn
	<i>Rps. julia</i> [46]	<i>Rps. palustris</i> [64]	<i>Rbi. orientis</i> [46]	<i>Rbi. marium</i> [46]	BN8
Màu sắc khuẩn lạc	Màu đỏ hồng	Màu đỏ nâu, đỏ	Hồng đến đỏ	Hồng đến đỏ	Đỏ đậm
Hình dạng tế bào	Hình que	Hình que với các đầu tròn	Hình que	Hình que	Hình que
Hình thức sinh sản	Nảy chồi	Nảy chồi	Nảy chồi	Nảy chồi	Nảy chồi
Kích thước tế bào (µm)	1-1,5	0,6-0,9	0,7-0,9	0,7-0,9	0,54 - 2,35
Phổ hấp thụ (nm)	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>	<i>Bchl a</i>
Nhu cầu NaCl cho sinh trưởng (%)	Không xác định	Không xác định	1-8	1-5	0-5 (0)
pH (tối ưu)	6-6,5	6,9	6-8,5 (7,5)	6,5-8 (7,5)	6-8,5 (7,5)
Khả năng chịu sulfide (mM)	2-3	2-5	Không xác định	Không xác định	0,6-5,4
Khả năng sử dụng carbon					
Benzoate	-	+	-	-	+
Citrate	-	+/-	-	+/-	+
Ethanol	-	+/-	-	-	-
Formate	+/-	+/-	-	+	-
Fructose	+/-	+	+	+	+
Glucose	+/-	+	+	+	+
Glutamate	+/-	+	-	+	+
Glycerol	+	+	-	+	+
Propanol	+/-	-	-	+	-
Propionate	+	+	-	+	+
Khả năng sử dụng nitrogen					
Glutamate	KXĐ	KXĐ	-	+	+
NH ₄ Cl	+	+	+	+	+
Urea	KXĐ	KXĐ	-	+	+

Ghi chú: (+) có khả năng sinh trưởng; (-): không có khả năng sinh trưởng; KXĐ: Không xác định.

3.4.2. Xác định trình tự gene 16S rRNA của các chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn

3.4.2.1. Giải trình tự gene 16S rRNA

DNA tổng số của 3 chủng VKTQH tuyển chọn được tiến hành tách chiết như mô tả trong phần phương pháp. Kết quả tách chiết DNA tổng số được kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy các băng DNA rõ nét, không đứt gãy và có kích thước lớn. Điều đó chứng tỏ DNA tổng số của 3 chủng VKTQH thu được có độ tinh sạch cao, hàm lượng đủ lớn và đủ tiêu chuẩn để được sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR tiếp theo.

Đoạn gene mã hóa 16S rRNA của 3 chủng VKTQH được nhân lên bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, kết quả cho băng DNA duy nhất, sáng rõ nét và có kích thước khoảng 1.500 bp, phù hợp với kích thước của gene mã hóa 16S rRNA ở VK. Sản phẩm PCR thu được đủ tiêu chuẩn để tiến hành giải trình tự gene.

Trình tự gene 16S rRNA của 3 chủng VKTQH được tiến hành so sánh với một số trình tự gene tương ứng trên ngân hàng cơ sở dữ liệu geneBank bằng công cụ BLAST (NCBI), kết quả được trình bày ở Bảng 3.11.

Bảng 3.11. So sánh kết quả giải trình tự gene 16S của 3 chủng VKTQH với một số trình tự gene tương ứng trên ngân hàng dữ liệu cơ sở geneBank bằng công cụ BLAST

Chủng	Trình tự gene 16S rRNA của chủng VK được so sánh	Độ tương đồng (%)	Mã số truy cập trên geneBank
ND42	<i>Rba. sphaeroides strain Dian8-15</i>	99,92	GQ503895.1
	<i>Rba. sphaeroides strain P230(7)</i>	99,92	MN605654.1
	<i>Rba. sphaeroides strain Z08</i>	99,92	MN605651.1
ST20	<i>Rhv. sulfidophilum strain W48</i>	100	KX823358.1
	<i>Rhv. sulfidophilum KKMI01 X</i>	100	LC596063.1
	<i>Rhv. sulfidophilum strain JA198</i>	99,6	AM696694.1
BN8	<i>Rps. palustris strain KTSSR54</i>	100	MN368295.1
	<i>Rps. palustris strain I3_6</i>	100	KT873846.1

Từ Bảng 3.11 cho thấy: gene 16S rRNA của chủng VKTQH ST20 có độ tương đồng cao (99,6% - 100%) so với gene 16S tương ứng của các loài *Rhv. sulfidophilum*. Kết hợp với các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa, chủng ST20 có thể thuộc loài *Rhv. sulfidophilum* và được định danh là *Rhv. sulfidophilum* ST20.

Gene 16S rRNA của chủng ND42 có độ tương đồng 99,92% so với gene 16S tương ứng của các chủng thuộc loài *Rba. sphaeroides*. Kết hợp với các đặc

điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa, chủng ND42 có thể thuộc loài *Rba. sphaeroides* và được định danh là *Rba. sphaeroides* ND42.

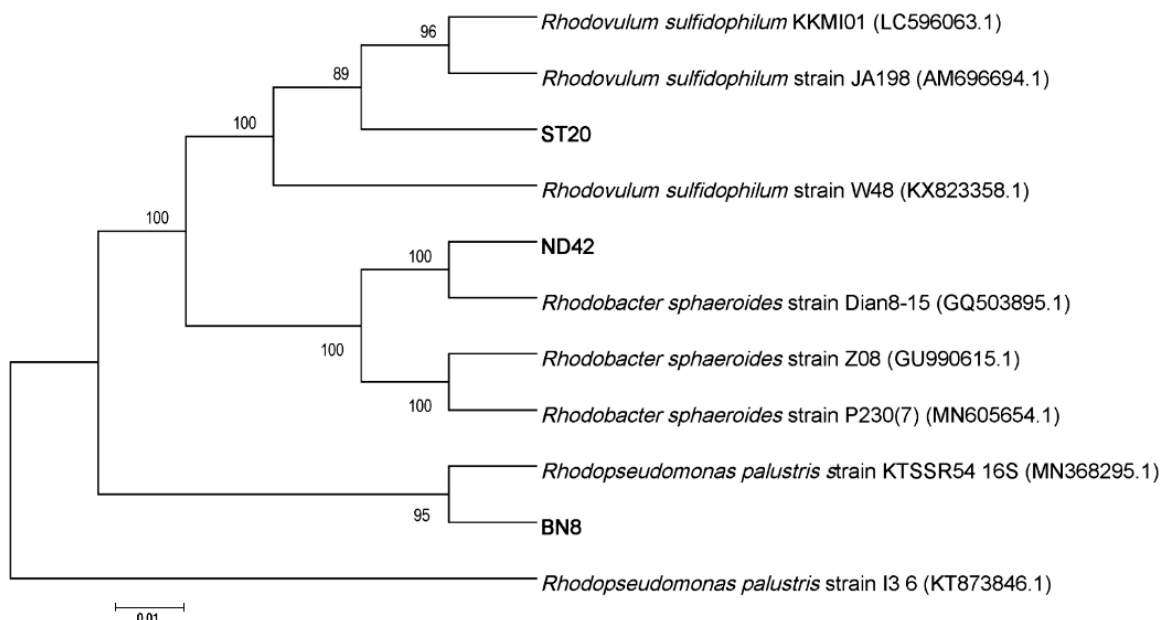
Gene 16S rRNA của chủng BN8 có độ tương đồng 100% so với trình tự gene tương ứng của các chủng thuộc loài *Rps. palustris*, kết hợp với các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa, chủng BN8 có thể thuộc loài *Rps. palustris* và được định danh là *Rps. palustris* BN8.

3.4.2.2. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp

Cây phát sinh chủng loại của các chủng VK nghiên cứu với các loài gần gũi được xây dựng bằng phần mềm MEGA X (Hình 3.16).

Từ cây phát sinh chủng loại (Hình 3.16) cho thấy chủng ND42 nằm cùng nhánh với các loài *Rba. sphaeroides* với chỉ số bootstrap 100, chủng ST20 nằm trong cùng một nhánh với các loài *Rhv. sulfidophilum* với chỉ số bootstrap 89, trong khi đó chủng BN8 nằm cùng nhánh với các loài *Rps. palustris* với chỉ số bootstrap 95.

Bằng phân tích trình tự đoạn gene mã hóa 16S rRNA của 3 chủng VKTQH lựa chọn kết hợp với một số đặc điểm sinh học, đã phân loại và định tên được 3 chủng VK lần lượt là: *Rba. sphaeroides* ND42, *Rhv. sulfidophilum* ST20, *Rps. palustris* BN8.



Hình 3.16. Cây phát sinh chủng loại của các chủng VKTQH tuyển chọn với một số loài trên geneBank

Như vậy, từ 774 chủng VKTQH bao gồm: 564 chủng VKTQH phân lập từ ao nuôi tôm và 210 chủng từ bộ sưu tập chủng giống lưu giữ tại phòng thí nghiệm

đã được sử dụng để sàng lọc các chỉ tiêu probiotic bao gồm: (1) khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* gây bệnh AHPND; (2) khả năng sinh enzyme tiêu hóa (gelatinase, protease, amylase, cellulase, lipase); (3) khả năng sinh trưởng ở pH 2 và môi trường chứa 0,3% muối mật; (4) khả năng tự kết dính và tạo màng biofilm. Kết quả đã tuyển chọn được 55 chủng VKTQH có đặc tính probiotic. Từ 55 chủng VKTQH có đặc tính probiotic đã tuyển chọn được 3 chủng: ND42, ST20, BN8 có hàm lượng dinh dưỡng cao (lipid > 20% TLK và PUFA > 30% TFA). Ba chủng VKTQH tuyển chọn: ND42, ST20, BN8 được phân tích các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa, trình tự gen 16S rRNA và được định danh có thể lần lượt là *Rhodobacter sphaeroides* ND42 và *Rhodovulum sulfidophilum* ST20, *Rhodopseudomonas palustris* BN8.

Các kết quả trong nghiên cứu đã góp phần trong việc xây dựng bộ chủng giống VKTQH bản địa tiềm năng, đáp ứng một số tiêu chí probiotic. Các chủng VKTQH này có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh, sản sinh enzyme tiêu hóa, chịu được điều kiện khắc nghiệt (pH thấp và muối mật) trong đường ruột hệ tiêu hóa, có khả năng tự kết dính và tạo màng biofilm và có hàm lượng dinh dưỡng cao. Đây là tiền đề quan trọng cho việc phát triển chế phẩm sinh học ứng dụng trong nuôi TTCT, góp phần nâng cao hiệu quả và tính bền vững của ngành NTTS.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

I. KẾT LUẬN

1. Từ 270 mẫu (bùn, nước và ruột tôm) thu tại các ao nuôi tôm ở 3 miền (6 tỉnh) đã phân lập được 564 chủng vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) bao gồm: Miền Bắc (Hải Phòng: 60 chủng, Nam Định: 72 chủng); Miền Trung (Nha Trang: 88 chủng, Phú Yên: 83 chủng) và Miền Nam (Bạc Liêu: 93 chủng, Sóc Trăng: 84 chủng).
2. Đã sàng lọc được 3 chủng VKTQH bao gồm: 2 chủng (ND42, ST20) từ 564 chủng phân lập tại ao nuôi tôm và 1 chủng (BN8) từ 261 chủng trong bộ sưu tập chủng giống lưu giữ tại phòng thí nghiệm có các đặc tính probiotic và hàm lượng dinh dưỡng cao cụ thể như sau:
 - Khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*: 2 chủng ST20, BN8 có khả năng đối kháng với 2 vi khuẩn gây bệnh và 1 chủng ND42 chỉ có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*.
 - Khả năng sinh enzyme tiêu hóa: cả 3 chủng đều có khả năng sinh đồng thời 2 hoặc 3 loại enzyme: gelatinase, protease, amylase, cellulase, lipase (1 chủng ND42 sinh gelatinase; 2 chủng ND42, ST20 sinh protease; 1 chủng ST20 sinh amylase; 1 chủng BN8 sinh cellulase; 2 chủng ST20, BN8 sinh lipase).
 - 3 chủng đều có khả năng chịu pH 2 với tỷ lệ sinh trưởng từ 51,9% - 65,6%; Có khả năng chịu 0,3% muối mật với tỷ lệ sinh trưởng trên 85,8% - 97,7%, có tỷ lệ tự kết dính từ 22,8% - 45,0%, có khả năng tạo màng biofilm với giá trị từ 5,7 - 8,4.
 - 3 chủng đều chứa hàm lượng lipid cao với tỷ lệ từ 23,1% - 26,8% (trọng lượng khô) và hàm lượng PUFA với tỷ lệ từ 31,0% - 42,3% (tổng acid béo).
3. Dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân tích trình tự gene 16S rRNA đã định danh được 3 chủng VKTQH có thể lần lượt là: *Rhodobacter sphaeroides* ND42, và *Rhodovulum sulfidophilum* ST20, *Rhodopseudomonas palustris* BN8.

II. KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục tiến hành nghiên cứu xác định các điều kiện nuôi cấy để sản xuất sinh khối VKTQH ở quy mô pilot.
- Tiến hành thử nghiệm 3 chủng VKQTH tuyển chọn được ký hiệu: ND42, ST20, BN8 làm chế phẩm sinh học trong nuôi tôm thẻ chân trắng.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lazado C. C., Caipang C. M. A., 2014, Mucosal Immunity and Probiotics in Fish, *Fish Shellfish Immunol*, 39, pp.78–89.
2. Hotel A. C. P., Cordoba A., 2001, Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, *Prevention*, 5(1), pp.1-10
3. Balcázar J.L., Blas I., Zarzuela I., Vendrell D., Gironés O., Muzquiz J. L., 2007, Use of Probiotics in Aquaculture, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(1), pp.185-193.
4. Balcázar J. L., Blas I., Ruiz I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J. L., 2006, The role of probiotics in aquaculture, *Vet Microbiol*, 114(3-4), pp. 173-186.
5. Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivoraku S., Menasaveta P., 2000, Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11), *Aquaculture*, 191(4), pp. 271-288.
6. Nikoskelainen S., Ouwehand A. C., Bylund G., Salminen S., Lilius E.M., 2003, Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*), *Fish Shellfish Immunol*, 15(5), pp. 443-452.
7. Nikoskelainen S., Ouwehand A. C., Bylund G., Salminen S., Lilius E.M., 2003, Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*), *Fish Shellfish Immunol*, 15(5), pp. 443-452.
8. Aly S.M., 2010, Probiotics and aquaculture, Perspectives in agriculture, veterinary science, *Nutrition and Natural Resources*, 403, pp. 13-19.
9. Kongnum K., Hongpattarakere T., 2012, Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*, *Fish Shellfish Immunol*, 32(1), pp. 170-177.
10. Wang A., Ran C., Wang Y., Zhang Z., Ding Q., Yang Y., Zhou Z., 2019, Use of probiotics in aquaculture of China-a review of the past decade, *Fish Shellfish Immunol*, 86, pp. 734-755.
11. Zokaeifar H., Balcázar J. L., Saad C. R., Kamarudin M. S., Sijam K., Arshad A., Nejat N., 2012, Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Fish Shellfish Immunol*, 33(4), pp. 683-689.
12. Liu K.F., Chiu C.H., Shiu Y.L., Cheng W., Liu C.H., 2010, Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* larvae), *Fish Shellfish Immunol*, 28(5-6), pp. 837-844.

13. Liu K.F., Chiu C.H., Shiu Y.L., Cheng W., Liu C.H., 2010, Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* larvae), *Fish Shellfish Immunol*, 28(5-6), pp. 837-844.
14. Azad S. A., Chong V. C., Vikineswary S., 2002, Phototrophic bacteria as feed supplement for rearing *Penaeus monodon* larvae, *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(2), pp. 158-168.
15. Chandrasekaran R. and Ashok Kumar G., 2011, Antagonistic Activities of Purple Non-sulfur Bacterial Extracts Against Antibiotic Resistant *Vibrio* sp, *Malaysian Journal of Microbiology*, 7, pp.54-56.
16. Peng M., Xu H., Yang G., Zhang G., 2021, Purifying heavily polluted river water using immobilized native photosynthetic bacteria, *Journal of Environmental Engineering*, 147(8), pp. 902-1021.
17. Imhoff J.F., Hiraishi A., Süling J., 2005, Anoxygenic phototrophic purple bacteria in Bergey's manual® of systematic bacteriology, *Springer*, 123, pp. 119-132.
18. Imhoff J.F., 2001, The anoxygenic phototrophic purple bacteria: Bergey's manual of systematic bacteriology, *Springer*, 1, pp. 631-637 .
19. Imhoff J.F., 2017, Diversity of anaerobic anoxygenic phototrophic purple bacteria, *Modern topics in the phototrophic prokaryotes: environmental and applied aspects*, 6, pp. 47-85.
20. Imhoff J. F., 1989, Purple Nonsulfur Bacteria, Bergey's manual of systematic bacteriology, 3, pp. 1658-1682.
21. Watanabe M., Sasaki K., Nakashimada Y., Kakizono T., Noparatnaraporn N., Nishio N., 1998, Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp, *Applied microbiology and biotechnology*, 50, pp. 682-691.
22. Cooper D. E., Rands M. B., Woo C.P., 1975, Sulfide Reduction in Fellingmongery Effluent by Red Sulfur Bacteria, *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 5, pp. 2088-2100.
23. Overmann J., Beatty J. T., Hall K. J., 1996, Purple sulfur bacteria control the growth of aerobic heterotrophic bacterioplankton in a meromictic salt lake, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), pp. 3251-3258.
24. Okubo Y., Futamata H., Hiraishi A., 2005, Distribution and capacity for utilization of lower fatty acids of phototrophic purple nonsulfur bacteria in wastewater environments, *Microbes and environments*, 20(3), pp. 135-143.
25. Kompantseva E. I., Komova A. V., Novikov A. A., Kostrikina N. A., 2012, *Rhodovulum tesquicola* sp. nov., a haloalkaliphilic purple non-sulfur bacterium from brackish steppe soda lakes, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(12), pp. 2962-2966.

26. Shapawi R., Ting T. E., Azad S., 2012, Inclusion of purple non-sulfur bacterial biomass in formulated feed to promote growth, feed conversion ratio and survival of Asian Seabass *Lates calcarifer* Juveniles, *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7(6), pp. 460-475.
27. Chumpol S., Kantachote D., Nitoda T., Kanzaki H., 2018, Administration of purple nonsulfur bacteria as single cell protein by mixing with shrimp feed to enhance growth, immune response and survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation, *Aquaculture*, 489, pp. 85-95.
28. Alloul A., Wille M., Bossier P., Vlaeminck S. E., 2021, Purple bacteria as added-value protein ingredient in shrimp feed: *Penaeus vannamei* growth performance, and tolerance against *Vibrio* and ammonia stress, *Aquaculture*, 530, pp. 735-788.
29. Chumpol S., Kantachote D., Rattanachuy P., Vuddhakul V., Nitoda T., Kanzaki H., 2017, *In vitro* and *in vivo* selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: acute hepatopancreatic necrosis disease - causing *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrios*, *Aquaculture research*, 48(6), pp. 3182-3197.
30. Seangtumnor N., Kantachote D., Nookongbut P., Sukhoom A., 2018, The potential of selected purple nonsulfur bacteria with ability to produce proteolytic enzymes and antivibrio compounds for using in shrimp cultivation, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, pp. 138-144.
31. Torpee S., Kantachote D., Sukhoom A., Tantirungkij M., 2022, Culture optimization to enhance carotenoid production of a selected purple nonsulfur bacterium and its activity against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(6), pp. 2422-2436.
32. Wang Y., 2011, Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* and *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fingerlings, *Aquaculture nutrition*, 17(2), pp. 372-378.
33. Koga A., Goto. M., Hayashi S., Yamamoto S., Miyasaka H., 2022, Probiotic effects of a marine purple non-sulfur bacterium, *Rhodovulum sulfidophilum* KKMI01, on kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*), *Microorganisms*, 10(2), pp. 239-244.
34. Fang L. C., Li Y., Cheng P., Deng J., Jiang L. L., Huang H., Zheng J. S., Wei H., 2012, Characterization of *Rhodopseudomonas palustris* strain 2C as a potential probiotic, *Apmis*, 120(9), pp. 743-749.
35. Zhou X., Pan Y., Wang Y., Li W., 2007, *In Vitro* Assessment of Gastrointestinal Viability of Two Photosynthetic Bacteria, *Rhodopseudomonas Palustris* and *Rhodobacter Sphaeroides*, *Journal of Zhejiang University Science B*, 8, pp. 686-692.49. Zhang X., Shu M., Wang Y., Fu L., Li W., Deng B., Shen W., 2014, Effect of photosynthetic

- bacteria on water quality and microbiota in grass carp culture, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, pp. 2523-2531.
36. Azad A.S., Ransangan J., 2016, Efficacy of purple non-sulfur bacterium *Ařifella marina* strain ME to control dissolved inorganic nutrients in aquaculture system, *Transactions on Science and Technology*, 3(2-2), pp. 407-412.
 37. Bunruk P., Kantachote D., Sukhoom A., 2017, Isolation and selection of purple non-sulfur bacteria for phosphate removal in rearing water from shrimp cultivation, *Journal of Applied and Physical Sciences*, 3(2), pp.73-80.
 38. Chumpol S., Kantachote D., Nitoda T., Kanzaki H., 2017, The Roles of Probiotic Purple Nonsulfur Bacteria to Control Water Quality and Prevent Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) for Enhancement Growth with Higher Survival in White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) during Cultivation, *Aquaculture*, 473, pp. 327-336
 39. Dong D., Sun H., Qi Z., Liu X., 2021, Improving microbial bioremediation efficiency of intensive aquacultural wastewater based on bacterial pollutant metabolism kinetics analysis, *Chemosphere*, 265, pp. 129-151.
 40. Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân, Trần Thanh Phong, 2004, Nghiên cứu sản xuất chế phẩm VEM dùng trong nuôi trồng thủy sản, *Tuyển tập hội thảo toàn quốc về nghiên cứu và ứng dụng khoa học công nghệ trong nuôi trồng thủy sản*, NXB Nông nghiệp, tr. 911-917.
 41. Đỗ Thị Liên, 2016, *Nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn tía quang hợp để xử lý sulfide trong các nguồn nước ô nhiễm*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Hà Nội.
 42. Trần Việt Quyền, Trần Hoàng Khang, Trần Văn Bé, 2022, Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn tía không lưu huỳnh, thử nghiệm khả năng xử lý sunfide trong nước ao nuôi tôm tại huyện Kiên Lương, tỉnh Kiên Giang, *Tạp Chí Công Thương* , 380 (10), tr. 18-34.
 43. Hoàng Thị Yến, 2010, *Nghiên cứu vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh phân lập tại Việt Nam sử dụng làm thức ăn tươi sống cho con giống động vật hai mảnh vỏ*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Hà Nội.
 44. Hoàng Thị Yến, Đỗ Thị Tố Uyên, Đỗ Thị Liên, Trần Văn Nhị, 2016, Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh có khả năng tổng hợp lipid cao và có chứa axit béo không bão hoà đa nối đôi (PUFAs), *Tạp chí Công Nghệ sinh học*, 23, tr. 98-110.
 45. Hoàng Thị Yến, Vũ Đình Thúy, Thái Minh Phương, Trần Thu Hà, Lê Thị Minh Thành, Nguyễn Thị Thu Huyền, Đinh Thị Thu Hằng, Đỗ Thị Tuyên, 2023, Nghiên cứu nâng cao tỷ lệ sống ấu trùng hầu thái bình dương *Crassostrea Gigas* bằng cách sử dụng phối kết hợp giữa vi tảo và vi khuẩn tía quang hợp, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 5(147), tr. 78-94.

46. Kumar A.G., 2012, *Studies on purple non sulfur bacteria from shrimp ponds and their potential applications*, Ph.D.Thesis, Bharathidasan University, Indian.
47. Suwansaard M., Choorit W., Zeilstra-Ryalls J.H., 2009, Isolation of anoxygenic photosynthetic bacteria from Songkhla Lake for use in a two-staged biohydrogen production process from palm oil mill effluent, *International journal of hydrogen energy*, 34(17), pp. 7523-7529.
48. Hoàng Thị Yên, 2020, *Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất omega 6,7,9 từ vi khuẩn tía quang hợp ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm*, Báo cáo tổng kết, Bộ Công Thương.
49. Nguyễn Lâm Dũng, 1979, Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tr. 189-213 .
50. Yen. H. T., Quynh. T. T. T., Ha. C. H., Thanh. D. T., Hang, D. T. T., 2019, Identification and characterization of a purple nonsulfur bacterium isolated from coastal area of Hai Phong for using in production of unsaturated fatty acid (omega 6, 7, 9), *Vietnam Journal of Science and Technology*, 57(6), pp. 665-676.
51. Dương Nhật Linh, Nguyễn Văn Minh, Trần Thị Kim Sa, Trần Cát Đông, 2001, Tiềm năng probiotic của một số vi khuẩn Lactic phân lập từ sữa mẹ, *Tạp chí khoa học đại học mở thành phố hồ chí minh-kỹ thuật và công nghệ* , 6, tr. 67–73.
52. Đỗ Thị Bích Thủy và Nguyễn Thị Diễm Hương, 2018, Xác định khả năng chịu mặn và một số tính chất có tiềm năng probiotic của các chủng vi khuẩn Lactic thuộc loài *Lactobacillus fermentum* phân lập từ ruột cá nục *Decapterus Lajang*, *Tạp chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, tr. 799-806.
53. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Hoàng Phương Hà, Đồng Văn Quyền, Nguyễn Ngọc Hương Trà, Lê Thị Nhi Công, 2020, Đánh giá khả năng phân hủy naphthalene và pyrene của một số chủng vi khuẩn tía quang hợp tạo màng sinh học, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 81, tr. 561–570.
54. Devereux R. and Willis S.G.,1995, Amplification of ribosomal RNA sequences: Molecular microbial ecology manual, *Springer*, 13, pp. 277-287.
55. Kumar S., Stecher G., Li M., 2018, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Molecular biology and evolution*, 35(6), pp. 1547-1549.
56. Mukkata K., Kantachote D., Wittayaweerasak B., Mallavarapu M., Naidu R., 2016, Diversity of purple nonsulfur bacteria in shrimp ponds with varying mercury levels, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4), pp. 478-487.
57. Rattanachuy P., Kantachote D., Tantirungkij M., Nitoda T., Kanzaki H., 2010, Inhibition of shrimp pathogenic *Vibrios* by extracellular compounds

- from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp.W3, *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), pp. 8-9.
58. Carrillo F.O., Barrios A., Galvan S., Villasante F., 2007, A review of digestive enzyme activity in penaeid shrimps, *Crustaceana*, pp. 257-275.
 59. Gilliland S. E., Staley T. E., Bush L. J., 1984, Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct, *Journal of dairy science*, 67(12), pp. 3045-3051.
 60. Bùi Thị Việt Hà, 2021, *Nghiên cứu công nghệ sản xuất một số chế phẩm probiotic từ một số loài Lactobacillus sp. và Bacillus sp. ứng dụng nhằm nâng cao sức khỏe sinh sản cho phụ nữ*, Báo cáo tổng kết đề tài, Bộ Công Thương.
 61. Trần Thị Thanh Hiền, Phạm Minh Đức, Trần Lê Cẩm Tú, Trần Minh Phú, Nguyễn Vĩnh Tiến và Nguyễn Bảo Trung, 2014, Thay thế bột cá bằng một số nguồn bột đậu nành trong thức ăn cho cá lóc *Channa Striata*, *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ*, 15, tr. 310–318.
 62. Hiraishi A. and Ueda Y., 1995, Isolation and characterization of *Rhodovulum strictum* sp. nov. and some other purple nonsulfur bacteria from colored blooms in tidal and seawater pools, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), pp. 319-326.
 63. Hiraishi A., Muramatsu K., Ueda Y., 1996, Molecular genetic analyses of *Rhodobacter azotoformans* sp. nov. and related species of phototrophic bacteria, *Systematic and applied microbiology*, 19(2), pp. 168-177.
 64. Li M., Ning P., Sun Y., 2022, Characteristics and Application of *Rhodopseudomonas palustris* as a Microbial Cell Factory, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10F, pp. 197-203.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Nguyễn Thị Thu Huyền, Phạm Thanh Trang, Đinh Thị Thu Hằng, **Trần Thu Hà**, Hoàng Thị Yên, “Chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter sphaeroides* phân lập từ ao nuôi tôm tỉnh Nam Định có khả năng sinh enzyme và kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên* .
2. **Trần Thu Hà**, Phạm Thanh Trang, Đinh Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Thu Huyền, Hoàng Thị Yên, “Chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodovulum sulfidophilum* ST20 có tiềm năng sử dụng làm probiotic trong nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)”, *Hội nghị Khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học 2024*.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Bảng kết quả xác định khả năng chịu acid (ở pH 2) của các chủng vi khuẩn tía quang hợp nghiên cứu trong dịch dạ dày mô phỏng trong 180 phút

STT	Tên chủng	Mật độ tế bào sống (logCFU/ml)		Tỷ lệ sinh trưởng (%)
		0 phút	180 phút	
1	HP10	8,57±0,05	4,75±0,04	55,43±0,47
2	HP11	8,32±0,05	5,74±0,05	68,99±0,73
3	HP19	8,33±0,02	5,06±0,03	60,74±0,83
4	HP22	8,76±0,03	5,20±0,06	59,36±0,58
5	HP30	8,96±0,04	6,12±0,03	68,30±1,35
6	HP31	8,37±0,05	4,90±0,05	58,54±1,24
7	HP40	8,87±0,04	6,11±0,02	68,88±0,56
8	HP43	8,17±0,06	5,01±0,03	61,32±0,92
9	HP70	8,33±0,03	5,58±0,04	66,99±0,98
10	ND20	8,32±0,05	3,45±0,04	41,47±1,61
11	ND25	8,43±0,06	5,75±0,04	68,21±0,68
12	ND37	8,83±0,02	5,01±0,03	56,74±0,84
13	ND40	8,10±0,04	3,13±0,03	38,64±0,96
14	ND42	8,86±0,04	4,60±0,03	51,92±1,37
15	ND74	8,25±0,04	4,51±0,06	54,67±0,94
16	ND80	8,84±0,04	5,00±0,05	56,56±0,69
17	ND85	8,56±0,04	5,10±0,03	59,58±1,52
18	NT1	8,71±0,03	3,76±0,03	43,17±1,12
19	NT10	8,81±0,02	4,73±0,04	53,69±0,54
20	NT20	8,42±0,03	5,06±0,04	60,10±0,62
21	NT40	8,10±0,03	4,60±0,06	56,79±0,33
22	NT43	8,45±0,03	5,52±0,04	65,33±1,51
23	NT50	8,74±0,04	5,04±0,03	57,67±0,99
24	NT52	8,44±0,03	4,69±0,05	55,57±1,03
25	NT64	8,36±0,04	3,37±0,05	40,31±1,18
26	NT65	8,48±0,04	4,93±0,04	58,14±1,16
27	NT67	8,83±0,03	4,79±0,03	54,25±1,56
28	NT69	8,81±0,02	3,64±0,04	41,32±1,29
29	NT75	8,84±0,04	3,62±0,02	40,95±0,54
30	NT86	8,72±0,03	4,76±0,04	54,59±0,70
31	NT95	8,76±0,03	4,62±0,06	52,74±0,45
32	PY19	8,12±0,06	4,94±0,06	60,84±1,29
33	PY20	8,38±0,04	4,71±0,03	56,21±1,47
34	PY21	8,85±0,05	4,82±0,02	54,46±1,41
35	PY24	8,13±0,04	4,81±0,04	59,16±1,43
36	PY26	8,37±0,06	5,02±0,03	59,98±1,39
37	PY30	8,32±0,04	3,67±0,03	44,11±0,98

III

STT	Tên chủng	Mật độ tế bào sống (logCFU/ml)		Tỷ lệ sinh trưởng (%)
		0 phút	180 phút	
38	PY35	8,82±0,04	4,93±0,06	55,90±1,10
39	ST15	8,77±0,05	5,03±0,05	57,35±1,35
40	ST20	8,76±0,02	5,75±0,05	65,64±1,12
41	ST25	8,45±0,02	4,77±0,03	56,45±1,60
42	ST30	8,17±0,05	4,98±0,06	60,95±0,69
43	ST36	8,51±0,04	5,02±0,05	58,99±0,67
44	ST45	8,27±0,03	3,28±0,06	39,66±1,25
45	ST52	8,69±0,03	5,30±0,04	60,99±0,96
46	ST53	8,58±0,03	3,36±0,03	39,16±1,21
47	ST61	8,86±0,03	4,97±0,05	56,09±1,10
48	ST70	8,15±0,04	3,08±0,05	37,79±1,54
49	ST87	8,13±0,04	3,24±0,04	39,85±0,98
50	BL102	8,33±0,02	3,67±0,02	44,06±0,85
51	BL29	8,42±0,05	4,93±0,01	58,55±0,73
52	BL40	8,87±0,05	6,09±0,03	68,66±1,35
53	BL48	8,13±0,03	5,38±0,03	66,17±0,95
54	BL69	8,23±0,03	3,23±0,04	39,25±1,5
55	BL82	8,24±0,02	3,42±0,04	41,50±1,35
56	BL84	8,71±0,06	3,37±0,04	38,69±1,28
57	BL85	8,81±0,06	3,39±0,05	38,48±1,27
58	BL93	8,76±0,03	3,35±0,04	38,24±0,72
59	BL98	8,29±0,05	3,43±0,05	41,38±1,22
60	BN8	8,13±0,05	4,59±0,03	56,46±1,58
61	ND33	8,87±0,05	4,92±0,03	55,47±1,18

**Phụ lục 2: Bảng kết quả khả năng chịu muối mật của các chủng vi khuẩn
tía quang hợp nghiên cứu**

STT	Ký hiệu chủng	Mật độ tế bào sống (logCFU/ml)		Tỷ lệ sinh trưởng (%)
		0 phút	240 phút	
1	HP10	8,51±0,05	8,32±0,04	97,77±0,47
2	HP11	8,41±0,05	7,31±0,02	86,92±0,34
3	HP19	8,30±0,05	8,11±0,03	97,71±0,31
4	HP22	8,61±0,05	8,03±0,05	93,26±0,33
5	HP30	8,13±0,05	7,11±0,02	87,45±0,44
6	HP31	8,47±0,05	7,03±0,04	83,00±0,14
7	HP40	8,15±0,05	7,23±0,03	88,71±0,47
8	HP43	8,33±0,05	7,43±0,04	89,20±0,44
9	HP70	8,77±0,05	8,58±0,03	97,80±0,32
10	ND20	8,78±0,05	7,65±0,02	87,13±0,42
11	ND25	8,52±0,05	8,15±0,04	95,66±0,37
12	ND37	8,70±0,05	8,39±0,04	96,44±0,52
13	ND40	8,83±0,05	7,45±0,03	84,37±0,44
14	ND42	8,59±0,05	7,99±0,04	93,02±0,46
15	ND74	8,29±0,05	7,31±0,02	88,18±0,22
16	ND80	8,55±0,05	8,34±0,04	97,54±0,39
17	ND85	8,66±0,05	8,01±0,04	92,49±0,49
18	NT1	8,81±0,05	7,93±0,04	90,01±0,18
19	NT10	8,57±0,05	7,01±0,03	81,80±0,46
20	NT20	8,35±0,05	8,09±0,03	96,89±0,23
21	NT40	8,55±0,05	8,33±0,03	97,43±0,26
22	NT43	8,35±0,05	7,03±0,04	84,19±0,37
23	NT50	8,27±0,05	8,09±0,02	97,82±0,43
24	NT52	8,76±0,05	8,59±0,03	98,06±0,39
25	NT64	8,67±0,05	7,40±0,03	85,35±0,28
26	NT65	8,77±0,05	8,02±0,02	91,45±0,37
27	NT67	8,70±0,05	7,04±0,03	80,92±0,21
28	NT69	8,31±0,05	8,03±0,05	96,63±0,32
29	NT75	8,58±0,05	7,91±0,03	92,19±0,27
30	NT86	8,66±0,05	7,55±0,03	87,18±0,15

STT	Ký hiệu chủng	Mật độ tế bào sống (logCFU/ml)		Tỷ lệ sinh trưởng (%)
		0 phút	240 phút	
31	NT95	8,36±0,05	7,03±0,02	84,06±0,49
32	PY19	8,63±0,05	8,46±0,05	98,03±0,13
33	PY20	8,72±0,05	7,98±0,03	91,51±0,28
34	PY21	8,76±0,05	8,07±0,03	92,12±0,18
35	PY24	8,57±0,05	8,37±0,04	97,61±0,34
36	PY26	8,58±0,05	8,42±0,03	98,14±0,42
37	PY30	8,87±0,05	7,92±0,04	89,29±0,35
38	PY35	8,46±0,05	8,11±0,02	95,86±0,49
39	ST15	8,34±0,05	8,14±0,03	97,60±0,25
40	ST20	8,40±0,05	8,18±0,05	97,38±0,25
41	ST25	8,36±0,05	7,03±0,04	84,09±0,13
42	ST30	8,42±0,05	7,12±0,02	84,56±0,42
43	ST36	8,37±0,05	8,15±0,04	97,37±0,24
44	ST45	8,90±0,05	8,67±0,04	97,42±0,14
45	ST52	8,90±0,05	7,03±0,05	78,99±0,33
46	ST53	8,74±0,05	8,55±0,02	97,83±0,26
47	ST61	8,38±0,05	8,18±0,05	97,61±0,44
48	ST70	8,69±0,05	7,39±0,03	85,04±0,37
49	ST87	8,35±0,05	8,24±0,05	94,49±0,23
50	BL102	8,55±0,05	8,36±0,02	97,78±0,36
51	BL29	8,60±0,05	8,45±0,05	94,07±0,31
52	BL40	8,45±0,05	7,14±0,04	84,50±0,15
53	BL48	8,25±0,05	8,15±0,03	94,42±0,16
54	BL69	8,37±0,05	7,29±0,02	87,10±0,48
55	BL82	8,40±0,05	7,09±0,05	84,40±0,24
56	BL84	8,47±0,05	7,75±0,03	91,50±0,26
57	BL85	8,42±0,05	8,05±0,02	95,61±0,35
58	BL93	8,87±0,05	7,09±0,03	79,93±0,36
59	BL98	8,13±0,05	7,38±0,03	90,77±0,29
60	BN8	8,17±0,05	7,01±0,02	85,80±0,45
61	ND33	8,87±0,05	7,92±0,02	89,29±0,41

Phụ lục 3: Bảng kết quả xác định khả năng tự kết dính của các chủng vi khuẩn tía quang hợp nghiên cứu

STT	Ký hiệu chủng	Khả năng tự kết dính	
		OD ₆₆₀ sau 5h	Tỷ lệ kết dính (%)
1	HP10	0,275±0,018	45,00±1,29
2	HP11	0,263±0,010	47,41±1,25
3	HP19	0,347±0,023	30,61±1,12
4	HP22	0,271±0,022	45,82±1,61
5	HP30	0,487±0,011	2,62±0,93
6	HP31	0,480±0,019	4,01±1,23
7	HP40	0,370±0,013	26,24±1,03
8	HP43	0,369±0,019	26,26±1,01
9	HP70	0,291±0,021	41,86±1,05
10	ND20	0,364±0,021	27,24±1,54
11	ND25	0,361±0,020	27,83±1,29
12	ND37	0,417±0,017	16,62±1,43
13	ND40	0,482±0,018	3,61±1,55
14	ND42	0,386±0,023	22,80±0,32
15	ND74	0,314±0,019	37,29±0,38
16	ND80	0,428±0,030	14,47±1,12
17	ND85	0,439±0,029	12,23±1,34
18	NT1	0,37±0,020	26,63±0,99
19	NT10	0,368±0,013	26,43±0,94
20	NT20	0,479±0,030	4,28±0,83
21	NT40	0,39±0,025	22,37±0,46
22	NT43	0,489±0,017	2,28±1,05
23	NT50	0,361±0,018	27,82±1,27
24	NT52	0,39±0,025	22,27±0,34
25	NT64	0,425±0,015	15,17±0,41
26	NT65	0,36±0,017	28,85±1,24
27	NT67	0,382±0,016	23,64±0,54
28	NT69	0,367±0,015	26,61±1,39
29	NT75	0,358±0,011	28,48±0,96
30	NT86	0,366±0,011	26,81±1,11
31	NT95	0,306±0,016	38,86±0,74
32	PY19	0,386±0,013	22,83±0,98

VII

STT	Ký hiệu chủng	Khả năng tự kết dính	
		OD ₆₆₀ sau 5h	Tỷ lệ kết dính (%)
33	PY20	0,366±0,019	26,89±1,15
34	PY21	0,416±0,011	16,80±0,48
35	PY24	0,38±0,021	24,32±1,38
36	PY26	0,381±0,027	23,87±0,74
37	PY30	0,396±0,022	20,82±0,48
38	PY35	0,426±0,023	24,89±0,45
39	ST15	0,36±0,013	28,52±0,37
40	ST20	0,297±0,027	40,60±1,52
41	ST25	0,397±0,027	20,69±1,13
42	ST30	0,361±0,021	27,82±0,98
43	ST36	0,356±0,027	28,86±1,18
44	ST45	0,292±0,019	41,69±0,34
45	ST52	0,436±0,019	12,83±0,74
46	ST53	0,366±0,019	26,86±0,94
47	ST61	0,357±0,011	28,65±1,26
48	ST70	0,483±0,026	3,48±1,23
49	ST87	0,359±0,024	28,29±1,31
50	BL102	0,362±0,018	27,67±0,96
51	BL29	0,359±0,016	28,26±0,74
52	BL40	0,436±0,028	12,83±0,78
53	BL48	0,376±0,016	24,85±0,52
54	BL69	0,423±0,027	15,42±1,47
55	BL82	0,298±0,011	40,48±1,44
56	BL84	0,356±0,016	28,82±1,37
57	BL85	0,363±0,024	27,49±0,45
58	BL93	0,285±0,012	43,84±0,37
59	BL98	0,36±0,021	28,68±0,88
60	BN8	0,358±0,015	28,40±0,98
61	ND33	0,385±0,017	23,46±0,64

Phụ lục 4: Bảng kết quả xác định khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn tía quang hợp nghiên cứu

STT	Ký hiệu chủng	Giá trị tạo màng biofilm
1	HP10	8,17±0,32
2	HP11	8,47±0,39
3	HP19	7,46±0,24
4	HP22	6,96±0,54
5	HP30	2,34±0,82
6	HP31	2,81±0,90
7	HP40	6,25±0,72
8	HP43	4,45±0,47
9	HP70	7,79±0,23
10	ND20	6,36±0,73
11	ND25	6,11±0,13
12	ND37	4,81±0,44
13	ND40	2,64±0,82
14	ND42	5,65±0,82
15	ND74	7,31±0,89
16	ND80	4,61±0,26
17	ND85	4,58±0,29
18	NT1	6,21±0,21
19	NT10	6,25±0,3
20	NT20	1,03±0,69
21	NT40	5,5±0,45
22	NT43	1,92±0,36
23	NT50	6,57±0,27
24	NT52	5,39±0,39
25	NT64	4,75±0,56
26	NT65	6,57±0,22
27	NT67	5,78±0,88
28	NT69	6,28±0,13
29	NT75	6,85±0,61
30	NT86	6,29±0,6
31	NT95	7,47±0,68
32	PY19	4,44±0,48
33	PY20	6,31±0,90
34	PY21	4,91±0,79
35	PY24	4,51±0,19

IX

STT	Ký hiệu chủng	Giá trị tạo màng biofilm
36	PY26	4,37±0,5
37	PY30	5,15±0,87
38	PY35	5,74±0,62
39	ST15	6,58±0,75
40	ST20	7,67±0,01
41	ST25	5,12±0,44
42	ST30	6,56±0,18
43	ST36	6,88±0,67
44	ST45	7,78±0,32
45	ST52	4,43±0,27
46	ST53	6,28±0,64
47	ST61	6,86±0,65
48	ST70	1,32±0,9
49	ST87	6,62±0,51
50	BL102	6,59±0,21
51	BL29	6,74±0,45
52	BL40	5,11±0,7
53	BL48	5,82±0,69
54	BL69	4,28±0,81
55	BL82	7,63±0,7
56	BL84	6,88±0,51
57	BL85	6,47±0,3
58	BL93	8,17±0,7
59	BL98	6,43±0,17
60	BN8	6,76±0,18
61	ND33	5,69±0,68

Phụ lục 5: Khả năng tổng hợp lipid của các chủng vi khuẩn tia quang hợp nghiên cứu

STT	Tên chủng	Hàm lượng lipid (%TLK)			Giá trị lipid trung bình
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	
1	HP10	25,44	24,98	23,97	24,80±0,75
2	HP11	26,38	25,92	25,59	25,96±0,40
3	HP19	14,21	16,68	18,42	16,44±2,12
4	HP22	13,14	15,06	13,6	13,93±1,00
5	HP40	17,75	16,45	17,07	17,09±0,65
6	HP43	11,76	14,95	12,57	13,09±1,66
7	HP70	18,59	17,99	17,36	17,98±0,62
8	ND20	10,32	10,25	9,12	9,90±0,67
9	ND25	9,26	9,7	9,95	9,64±0,35
10	ND37	10,69	12,29	13,7	12,23±1,51
11	ND42	26,41	26,32	27,89	26,87±0,88
12	ND74	9,5	9,93	9,67	9,70±0,22
13	ND80	9,55	9,56	9,92	9,68±0,21
14	ND85	11,39	13,08	12,8	12,42±0,91
15	NT1	26,87	26,69	25,35	26,30±0,83
16	NT10	12,76	14,21	14,96	13,98±1,12
17	NT40	22,3	22,52	21,96	22,26±0,28
18	NT50	25,48	25,06	24,74	25,09±0,37
19	NT52	24,64	24,24	23,96	24,28±0,34
20	NT64	24,03	23,48	23,96	23,82±0,30
21	NT65	13,5	16,43	15,28	15,07±1,48
22	NT67	23,72	23,02	24,74	23,83±0,86
23	NT69	23,21	23,93	24,44	23,86±0,62
24	NT75	16,35	17,06	18,98	17,46±1,36
25	NT86	10,44	10,84	12,82	11,37±1,27
26	NT95	17,93	17,79	15,97	17,23±1,09
27	PY19	12,92	15,42	14,11	14,15±1,25
28	PY20	25,88	25,3	26,21	25,80±0,46
29	PY21	14,46	15,42	13,37	14,42±1,03

XI

30	PY24	19,04	20,5	21,37	20,30±1,18
31	PY26	14,55	12,77	11,39	12,90±1,58
32	PY30	9,07	9,96	9,89	9,64±0,49
33	PY35	23,43	22,99	23,16	23,19±0,22
34	ST15	26,07	25,3	24,28	25,22±0,90
35	ST20	25,98	26,83	25,06	25,96±0,89
36	ST25	19,99	17,18	16,04	17,74±2,03
37	ST30	19,65	19,27	21,96	20,29±1,46
38	ST36	15,29	18,03	18,34	17,22±1,68
39	ST45	12,87	15,33	13,45	13,88±1,29
40	ST52	21,06	19,74	21,61	20,8±0,96
41	ST53	19,41	19,25	21,39	18,68±1,12
42	ST61	21,8	20,92	18,03	20,25±1,97
43	ST87	22,15	22,3	21,68	22,04±0,32
44	BL102	24,23	24,13	25,01	24,46±0,48
45	BL29	11,45	13,46	12,61	12,51±1,01
46	BL40	24,8	24,35	25,51	24,89±0,58
47	BL48	11,51	13,59	11,33	12,14±1,26
48	BL69	15,31	17,15	17,95	16,80±1,35
49	BL82	15,9	13,03	15,07	14,67±1,48
50	BL84	22,64	21,03	20,32	21,33±1,19
51	BL85	15,37	16,11	15,07	15,52±0,54
52	BL93	11,3	12,88	13,5	12,56±1,13
53	BL98	21,78	20,72	20,85	21,12±0,58
54	BN8	26,38	26,28	25,19	25,95±0,66
55	ND33	18,88	19,98	21,85	18,90±1,07

Phụ lục 6: Trình tự trình tự gene 16S rRNA của 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn

Trình tự gene 16S rRNA của chủng BN8:

GTCGAACGGGCGTAGCAATACGTCAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGG
 TTCGGAACAACACAGGGAAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGGGAAAGATTTATCGCCGAAA
 GATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTG
 AGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
 TGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTT
 TTGTGCGGGAAGATAATGACGGTACC GCAAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGGTTTCTAAGTCAGAG
 GTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAAGTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGCAGAGGTGAGTGG
 AACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGGC
 CATTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 AACGATGAATGCCAGCCGTTAGTGGGTTACTACTAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATTCCGCTGG
 GGAGTACGGTGCAGAAATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCAGGACCGGTTCGACAGAGACGTGACCTT
 CTCTTCGAGCCTGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCCGTCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGAT
 AAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGCGGTGACAATGGGAAGCTAAGGGGTGACCCTTCGCAAATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCCGATTG
 GGCTCTGCAACTCGAGCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGT
 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCTGAAGACGGTGCCTAACT

Trình tự gene 16S rRNA của chủng ND42:

AGTCGAGCGAAGTCTTCGGACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTTGCT
 TCGGAATAGCCCCGGGAAACTGGGAGTAATACCGAATGTGCCCTTTGGGGGAAAGATTTATCGGCAAAGG
 ATCGGCCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGA
 GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTT
 AGACAATGGGCGCAAGCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGATCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGATCTTT
 CAGGTGGGAAGATAATGACGGTACCACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGGAGGGGGCTAGCGTTATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGGAAAGTCAGAGG
 TGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGAAACTCCCGATCTTGAGGTCGAGAGAGGTGAGTGGA
 ATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTC
 GATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
 ACGATGAATGCCAGTCGTCGGCAGCATGCTGTTCCGGTACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCTGGG
 GAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
 AATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATGGCGATCGCGGTTCCAGAGATGGTTCCTTCA
 GTTCGGCTGGATCGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTCCGGTTAAGTCC
 GGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGGGAAACTGCCGGTGATA
 AGCCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACMCACGTGCTACAA
 TGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCAAAAAGCTGTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGA
 AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCGCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCATGGGAATTGTTTCTACCCGAAGGCGGTGCGCCAACCTCGCAAGAGGAGGCGA

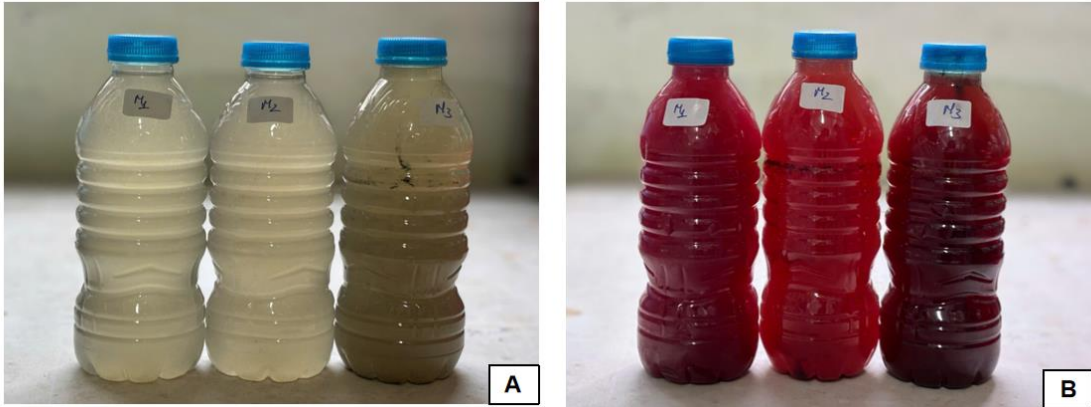
Trình tự gene 16S rRNA của chủng ST20:

TGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGTCGTGAAGATAATGACGGTAG
 CGACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGG
 AATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTCCGGGGTGAATCCCGGGGCTCAACCCCGG
 AACTGCCTCCGATACTGGTAGTCTAGAGTTTCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTC

XIII

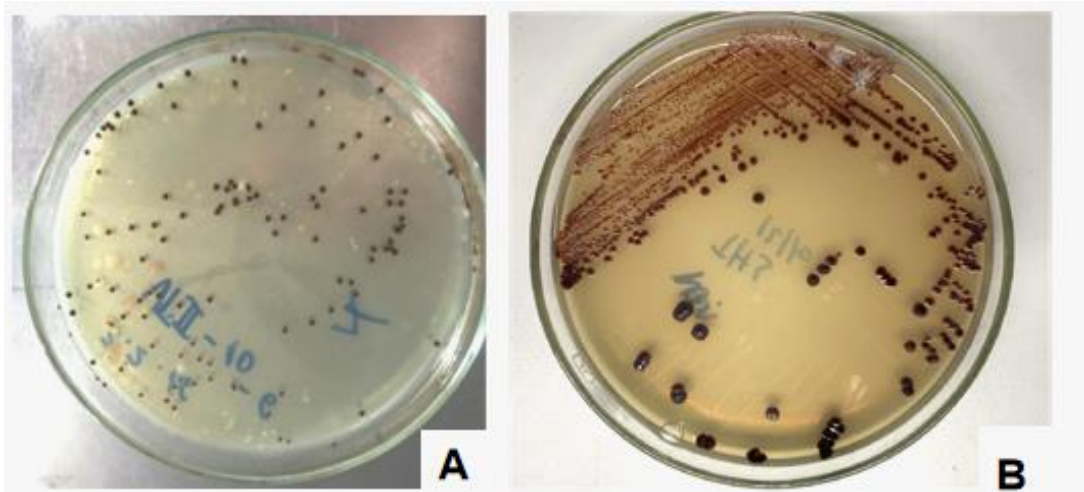
GTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGCAA
GCATGCTTGTTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCT
TACCAACCCTTGACATCCTGATCGCGGTTACCCGAGAGGGTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTC
TTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGAGAACTGCCGATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGAC
GTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTAAATCCC
AAAAAACTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGT
AACAGCATGACGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTTT
ACCCGAAGACGGTGCGCCAACCCCTTA

Phụ lục 7: Một số hình ảnh nghiên cứu



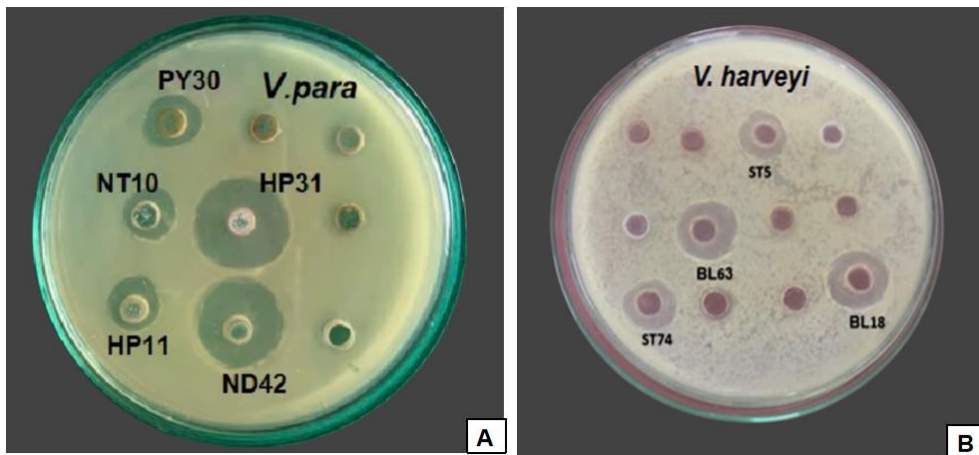
Hình ảnh minh họa quá trình làm giàu VKTQH

(A: Trước khi làm giàu; B: Sau 7-10 ngày làm giàu trên môi trường DSMZ-27)

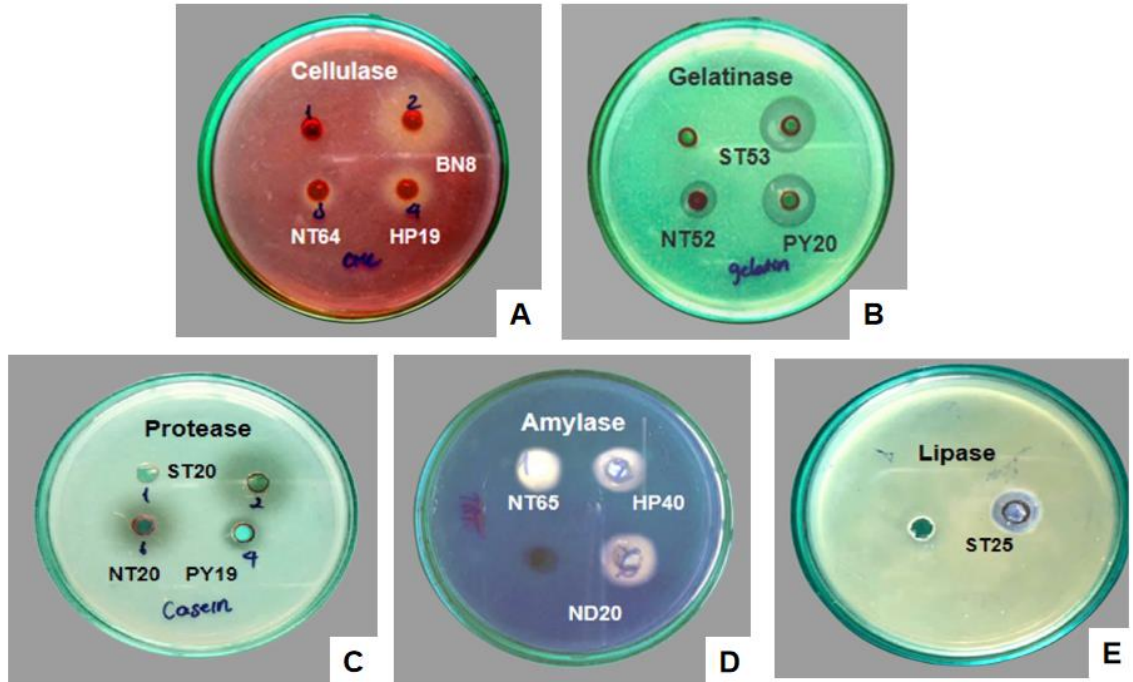


Hình ảnh minh họa kết quả phân lập và làm sạch các chủng VKTQH

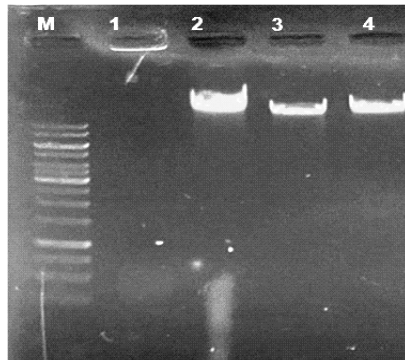
(A: Phân lập VKTQH ; B: Làm sạch VKTQH bằng phương pháp rìa cây 3 pha)



Hình ảnh minh họa khả năng đối kháng của các chủng VKTQH với *V. parahaemolyticus* (Hình A) và *V. harveyi* (Hình B)

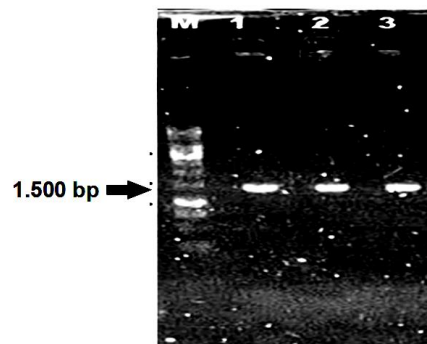


Hình ảnh minh họa khả năng enzyme của các chủng VKTQH
(A: enzym cellulase; B: enzyme gelatinase; C: enzyme protease;
D: enzyme amylase; E:lipase)



Hình ảnh kết quả điện di DNA tổng số

M: chỉ thị phân tử DNA 1kb marker; Giếng 1: đối chứng âm; Giếng 2,3,4: sản phẩm DNA tổng số của các chủng VKTQH lần lượt là: ND42, ST20, BN8.



Hình ảnh điện di đồ sản phẩm PCR

M: chỉ thị phân tử DNA 1kb marker; 1,2,3,4,5:sản phẩm PCR của các chủng VKTQH lần lượt là: HP10, ND42, PY35, ST20, BN8.

PURPLE NONSULFUR BACTERIUM STRAIN *RHODOBACTER SPHAEROIDES* ISOLATED FROM NAM DINH SHRIMP POND CAPACITY PRODUCING ENZYMES AND ANTAGONISM TO *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Nguyen Thi Thu Huyen¹, Pham Thanh Trang², Dinh Thi Thu Hang³, Tran Thu Ha^{2,3}, Hoang Thi Yen^{2*}

¹TNU – University of Sciences, ²Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology

³Graduate University of Sciences and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 25/4/2024	Aquaculture has been faced with huge losses in productivity caused by diseases and water pollution. Therefore, the selection of bacteria strains that have both the ability to against pathogenic bacteria and producing enzymes to use as probiotics for the decomposition of organic matter, and reduce water pollution has been studied. Purple nonsulfur bacterium strain ND42 can inhibit <i>Vibrio parahaemolyticus</i> that causes AHPND with an inhibition zone diameter of 14.66±0.31 mm and capable of producing 2 enzymes gelatinase and proteinase with clear zones diameters of 3.38±0.64 mm and 5.23±1.40 mm, respectively. Using the 16S rRNA gene sequencing, strain ND42 may belong to the species <i>Rhodobacter sphaeroides</i> and was named <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ND42.
Revised: 31/5/2024	
Published: 06/6/2024	
KEYWORDS	
Purple nonsulfur bacteria	
Antivibrio compounds	
Bacterial enzymes	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>V. parahaemolyticus</i>	

CHŨNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP *RHODOBACTER SPHAEROIDES* PHÂN LẬP TỪ AO NUÔI TÔM TỈNH NAM ĐỊNH CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYME VÀ KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Nguyễn Thị Thu Huyền¹, Phạm Thanh Trang², Đinh Thị Thu Hằng³, Trần Thu Hà^{2,3}, Hoàng Thị Yến^{2*}

¹Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

²Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 25/4/2024	Ngành thủy sản đang phải đối mặt với nhiều thiệt hại lớn về năng suất do tình trạng dịch bệnh và ô nhiễm nước. Vì vậy, hiện nay nhiều nhà nghiên cứu đã tiến hành tìm kiếm và lựa chọn các dòng vi khuẩn vừa có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh và vừa có khả năng sinh các enzyme sử dụng làm probiotic, phân hủy chất hữu cơ, giảm ô nhiễm nguồn nước. Chúng vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) ND42 vừa có khả năng đối kháng vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 14,66±0,31 mm; đồng thời có khả năng sinh tổng hợp 2 loại enzyme gelatinase và proteinase (kích thước vòng phân giải của 2 enzyme lần lượt là 3,38±0,64 mm và 5,23±1,40 mm) đã được lựa chọn sử dụng làm chế phẩm sinh học ứng dụng trong nuôi tôm thẻ chân trắng. Bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA, chủng ND42 được xác định thuộc loài <i>Rhodobacter sphaeroides</i> và được đặt tên là <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ND42.
Ngày hoàn thiện: 31/5/2024	
Ngày đăng: 06/6/2024	
TỪ KHÓA	
Vi khuẩn tía quang hợp	
Kháng khuẩn	
Sinh enzyme	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>V. parahaemolyticus</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10215>

* Corresponding author. Email: hoangyen.ibt@gmail.com

1. Giới thiệu

Hàng năm ngành thủy sản đã đóng góp khoảng 3-4% tổng GDP của Việt Nam, trong đó có nuôi tôm nước lợ. Năm 2023, tổng sản lượng thủy sản đạt 9,23 triệu tấn, tăng 2,2% so với cùng kỳ năm 2022. Sản lượng nuôi trồng ước đạt 5,45 triệu tấn, sản lượng khai thác đạt 3,85 triệu tấn [1]. Trong đó, sản lượng tôm năm 2023 đạt 1,21 triệu tấn, tăng 5,8% so với năm 2022 [1].

Cùng với sự phát triển về năng suất thì ngành này cũng đang phải đối mặt với nhiều khó khăn như ô nhiễm môi trường nước và dịch bệnh, mà đặc biệt là bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) với tỷ lệ chết lên đến 100% do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra [2].

Để hạn chế dịch bệnh, người nuôi thường sử dụng kháng sinh và việc sử dụng kháng sinh lâu dài sẽ dẫn tới tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản, làm ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Do vậy, việc sử dụng chủng vi khuẩn vừa có khả năng sinh các enzyme hỗ trợ tiêu hoá thức ăn, đồng thời có khả năng sinh chất kháng khuẩn đối kháng với vi khuẩn gây bệnh được đánh giá là một giải pháp tiềm năng và đạt hiệu quả cao.

Một số vi sinh vật thường được sử dụng làm chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản điển hình thuộc các chi *Bacillus*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Lactobacillus*, *Propiobacterium*... và gần đây các nhà khoa học còn quan tâm tới nhóm vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) bởi những vai trò của chúng trong việc kiểm soát chất lượng nước (giảm H₂S, kim loại nặng, COD...) [3]-[5]; cung cấp nguồn protein đơn bào (SCP) [6], [7] và sử dụng làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản [8]-[13].

Ở Việt Nam, nhóm VKTQH đã và đang được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như xử lý nước thải đậm đặc hữu cơ [14], xử lý sulfide trong các nguồn nước ô nhiễm [15], sử dụng làm thức ăn tươi sống cho con giống động vật biển [16]. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có công bố nào về việc tuyển chọn VKTQH sử dụng làm probiotic trong nuôi tôm thẻ chân trắng. Do đó, bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu lựa chọn chủng VKTQH vừa có khả năng sinh enzyme phân hủy chất hữu cơ giảm ô nhiễm môi trường nước ao nuôi và vừa có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng VKTQH ND42 được phân lập từ nước ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại xã Giao Phong, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định.

Chủng vi khuẩn kiểm định *Vibrio parahaemolyticus* BLV10 chứa 02 gen độc *PirA*, *PirB* được phân lập từ tôm bị bệnh AHPND tại xã Vĩnh Bình, huyện Hòa Bình, tỉnh Bạc Liêu và được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường nuôi cấy VKTQH là môi trường GA bao gồm cao nấm men (2 g/L); acetate (5,44 g/L); K₂HPO₄ (0,5 g/L); (NH₄)₂HPO₄ (0,8 g/L); KH₂PO₄ (0,5 g/L); MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L); CaCl₂.2H₂O (0,053 g/L); vi lượng SL6^(*) (1 mL/L); dung dịch vitamin B₁₂^(**) (10 mg trong 100 mL nước) (0,4 mL/L); glutamate (3,8 g/L); NaCl (15 g/L); pH 6,8-7,0.

(*) Thành phần dung dịch vi lượng SL6: CoCl₂.6H₂O (0,25 g/L); CuCl₂.5H₂O (0,01 g/L); MnCl₂.4H₂O (0,07 g/L); ZnCl₂ (0,1 g/L); NiCl₂.6H₂O (0,01 g/L); Na₂SiO₃.5H₂O (0,01 g/L); FeCl₂.4H₂O (1,8 g/L); H₃BO₃ (0,5 g/L); Na₂MoO₄.2H₂O (0,03 g/L); H₂O 1 lít.

(**) Dung dịch vitamin B₁₂ được khử trùng bằng màng lọc và bổ sung vào môi trường trước khi sử dụng.

Môi trường TSB (Tryptic Soy Broth) sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có thành phần casein peptone 15 g; soya peptone 5 g; NaCl 15 g; nước cất vừa đủ 1.000 mL.

Môi trường TSA sử dụng để xác định khả năng VKTQH đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gồm tryptone 15 g; soytone 5 g; NaCl 15 g; agar 15 g; nước cất 1.000 mL.

Môi trường GA thạch (1,5% agar) có bổ sung từng loại cơ chất là 1% gelatin; 1% casein; 1% tinh bột; 0,5% CMC và 1% tributyrin tương ứng để xác định khả năng sinh enzyme gelatinase, proteinase, amylase, cellulase và lipase.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy VKTQH

VKTQH được nuôi trong lọ peniciline có thể tích 13 ml (chứa 10 ml) môi trường GA lỏng, đậy kín bằng nút cao su để hạn chế oxy xâm nhập, bổ sung NaCl 15 g/l, nhiệt độ 28-30°C, ánh sáng khoảng 5.000 lux. Sau 2-7 ngày thu dịch nuôi cấy để xác định khả năng đối kháng với *V. paraheamolyticus* và khả năng sinh enzyme.

2.2.2. Phương pháp xác định khả năng đối kháng

Tiến hành tiền sàng lọc sử dụng phương pháp 2 lớp thạch

Chủng vi khuẩn *V. paraheamolyticus* được nuôi trong môi trường TSB lỏng, nhiệt độ 28-30°C, lắc 150 vòng/phút. Sau 18h nuôi cấy, thu dịch vi khuẩn và điều chỉnh mật độ tế bào 1×10^5 CFU/ml ($OD_{660}=0,1$) [13].

VKTQH nuôi trong môi trường GA sau 2 ngày nuôi thu dịch và điều chỉnh mật độ tế bào $OD_{660} = 0,5$; hút 10 μ l mẫu VKTQH nhỏ lên trên bề mặt đĩa thạch (môi trường TSA) và tiếp tục nuôi ở điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng trong 5 ngày.

Khi nhiệt độ môi trường TSA đạt khoảng 40°C thì bổ sung 10% giống vi khuẩn *V. paraheamolyticus* đã chuẩn bị như trên, lắc đều và đổ một lớp mỏng lên trên đĩa thạch chứa môi trường TSA đã nuôi VKTQH được 5 ngày. Tiến hành nuôi các đĩa này ở 30-32°C trong 18 giờ và xác định hoạt tính kháng khuẩn thông qua vòng vô khuẩn.

Xác định khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch

Sau 7 ngày nuôi cấy VKTQH tiến hành ly tâm dịch ở 8.000 vòng/15 phút, sau đó tiến hành cô đặc dịch bằng phương pháp đông khô. Dịch sau khi đông khô được hòa tan lại trong metanol (10%) để được nồng độ đậm đặc gấp 20 lần so với dịch nuôi ban đầu. Đối chứng là methanol 10%. Hút 50 μ L dịch vi khuẩn kiểm định lên bề mặt đĩa thạch TSA và trang đều. Tiến hành đục lỗ trên đĩa thạch và hút 120 μ L dịch VKTQH đã được cô đặc nhỏ vào giếng thạch, ủ ở 35°C trong 18h [13]. Hoạt tính kháng khuẩn (HTKK) của VKTQH được xác định theo công thức (1):

$$\text{HTKK} = D - d \text{ (mm)} \quad (1)$$

Trong đó: D: Đường kính vòng vô khuẩn + đường kính lỗ khoan.

d: Đường kính lỗ khoan.

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme

VKTQH sau 2 ngày nuôi cấy được điều chỉnh về mật độ $OD_{660} = 1$, sau đó hút 50 μ l nhỏ vào từng giếng thạch chứa các cơ chất gelatin, casein, tinh bột tan, CMC và tributyrin để tiến hành nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp các loại enzyme tương ứng là gelatinase, protease, amylase, cellulase và lipase cần khảo sát khả năng sinh enzyme. Các đĩa được ủ trong điều kiện hiếu khí - tối, nhiệt 30-32°C, trong 5 ngày [13]. Để làm rõ sự xuất hiện của vòng phân giải cơ chất, cần tiến hành nhuộm đĩa thạch với dung dịch Lugol đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải tinh bột tan, với dung dịch Congo Red 1% (trong 15 phút; rửa lại bằng NaCl 1M) đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải CMC, với dung dịch Frazier đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải gelatin và casein. Riêng đối với sự phân giải tributyrin, sự phân giải tributyrin sẽ tạo thành vòng hơn trên nền môi trường có màu trắng đục, do vậy không cần thêm sự hỗ trợ để hiện vòng. Hoạt tính sinh enzyme (HT) được xác định thông qua vòng phân giải cơ chất theo công thức (2):

$$\text{HT} = D - d \text{ (mm)} \quad (2)$$

Trong đó: D: Đường kính vòng phân giải + đường kính lỗ khoan.

d: Đường kính lỗ khoan.

2.2.4. Phương pháp định danh vi khuẩn sử dụng gene 16S rRNA

Tách chiết DNA tổng số: VKTQH sau khi nuôi tăng sinh trong môi trường GA được cho vào ống eppendorf 1,5 mL, tiến hành thu sinh khối bằng cách ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút. Sử dụng kit Gen JET (Thermo) để tách DNA tổng số, xác định chất lượng DNA bằng điện di trên gel agarose 1%.

Phản ứng PCR: Gene 16S rRNA được phân lập sử dụng cặp mồi có trình tự mồi xuôi F1 (5'-AGAGTTTTCCTGGCTCAG-3') và mồi ngược R1 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') được thiết kế theo. Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng thể tích 25 μ l) gồm 12,5 μ l master mix; 1 μ l mồi mỗi loại (10 pmol); 1,0 μ l DNA khuôn; 9,5 μ l nước cất vô trùng. Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình: 95°C/3 phút; 30 chu kỳ (95°C/30 giây; 50°C/45 giây; 72°C/50 giây; 72°C/8 phút) và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và tiến hành tinh sạch trước khi đọc trình tự. Sản phẩm PCR chứa đoạn gen 16S rRNA được giải trình tự theo phương pháp sử dụng các dideoxynucleotide của Sanger bằng máy giải trình tự gen tự động. Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên GenBank bằng chương trình BLAST để định danh loài vi khuẩn. Sau đó, sử dụng phần mềm Mega 11 để xây dựng cây chủng loại của các chủng vi khuẩn nghiên cứu với các loài gần gũi.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

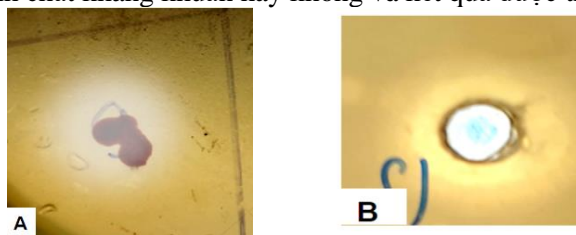
Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần độc lập. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (TB \pm SD). Tính toán số liệu được thực hiện bằng phần mềm Microsoft Excel phiên bản 2019.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khả năng đối kháng với vi khuẩn *V. paraheamolyticus* của VKTQH

Kết quả tiền khảo sát khả năng đối kháng của chủng ND42 với vi khuẩn gây bệnh *V. paraheamolyticus* bằng phương pháp đối kháng trực tiếp trên 2 lớp thạch cho thấy chủng VKTQH ND42 có xuất hiện vùng sáng xung quanh (Hình 1A).

Phương pháp đối kháng trực tiếp trên 2 lớp thạch chỉ cho biết chủng khảo sát có đối kháng hay không mà không biết rõ chủng này sinh hợp chất kháng khuẩn hay đối kháng do cạnh tranh dinh dưỡng. Do đó, thí nghiệm tiếp theo sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để xác định chủng ND42 có sinh chất kháng khuẩn hay không và kết quả được trình bày ở Hình 1B.



Hình 1. Kết quả đối kháng của chủng ND42 với vi khuẩn *V. paraheamolyticus* gây bệnh AHPND (A: Đối kháng trực tiếp trên 2 lớp thạch, B: Phương pháp khuếch tán trên giếng thạch)

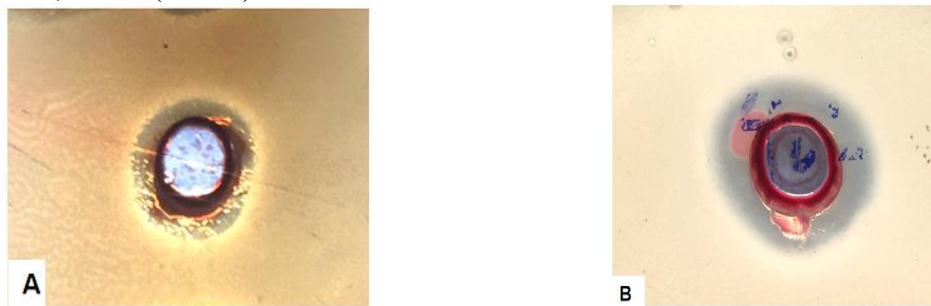
Hình 1B cho thấy, chủng ND42 có khả năng đối kháng với vi khuẩn *V. paraheamolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn là $14,66 \pm 0,31$ mm.

Theo nghiên cứu của Chumpoll khi tiến hành xác định khả năng đối kháng với vi khuẩn *V. paraheamolyticus* của các chủng VKTQH phân lập từ ao nuôi tôm ở một số tỉnh của Thái Lan, trong thí nghiệm này tác giả cũng tiến hành ly tâm, thu dịch và sử dụng phương pháp đông khô để làm đậm đặc 20 lần dịch nuôi cấy VKTQH [13]. Kết quả cho thấy VKTQH có khả năng ức chế vi khuẩn *V. paraheamolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 10-13 mm. Trong đó chủng TKW17 có khả năng ức chế mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn là 13,21 mm

[13]. Như vậy, so sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, chủng ND42 có đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn so với chủng TKW17 phân lập ở Thái Lan.

3.2. Khả năng sinh enzyme của chủng VKTQH

Sử dụng môi trường GA với 1,5% thạch và bổ sung mỗi loại cơ chất: gelatin, casein, tinh bột tan, CMC và tributyrin để xác định khả năng sinh các enzyme gelatinase, protease, amylase, cellulase và lipase tương ứng từ chủng ND42. Kết quả sau 5 ngày cho thấy chủng ND42 có khả năng sinh enzyme gelatinase và proteinase với đường kính vòng phân giải lần lượt là $3,38 \pm 0,64$ mm và $5,23 \pm 1,40$ mm (Hình 2).



Hình 2. Khả năng sinh enzyme gelatinase (A) và proteinase (B) của chủng VKTQH ND42

Chumpoll và cộng sự (2017) cũng tiến hành xác định khả năng sinh enzyme gelatinase của các chủng VKTQH. Kết quả đã tuyển chọn được 6 chủng có khả năng sinh enzyme mạnh nhất trong tổng số 185 đó là các chủng: S3W10, S3W11, SS15, STW181, W164, TKW17 với đường kính vòng phân giải từ 9,93-34,33 mm [13].

Như vậy, chủng ND42 có khả năng sinh enzyme gelatinase thấp hơn các chủng VKTQH trong nghiên cứu của Chumpol.

3.3. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA



Hình 3. Kết quả điện di DNA tổng số (A) và sản phẩm PCR nhân gene 16S rRNA của chủng ND42 (B) (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder)

```

1 agtcgagcga agtcttcgga cttagcggcg gacgggtgag taacgcgtgg gaacgtgccc
61 ttgtcttcg aatagccccc ggaaactggg agtaatacgc aatgtgcctt ttgggggaaa
121 gatttatcgg caaaggatcg gcccgcttgg gattaggtag ttggtggggt aatggcctac
181 caagccgacg atccatagct ggtttgagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg
241 gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaactctaga caatggggcg aagcctgac
301 taagcatgcc gcgtgatcga tgaagcctt agggttgtaa agatctttca ggtgggaaga
361 taatgacggt accaccagaa gaagcccccg ctaactcgtg gccagcagcc gcggtaatc
421 ggaaggggct agcgttattt ggaattactg ggcgtaaagc gcactagggc ggcgtgaaa
481 gtcagagggt aatcccagg gctcaacctt ggaactgcct ttgaaactcc ccatcttgag
541 gtcagagagc gtagtggaa ttccgagtgt agagtgaaa ttctagata ttccggaggaa
601 caccagtgcc gaaggcgct cactggctcg atactgacgc tgaagtgccg aagcgtgggg
661 agcaaacagg attagatacc ctgtagtccc accgctaaa cpatgattgc cagctctgg
721 gcagcatgct gttcgtgac acacctaacc gattaagcat tccgctggg gactcggcc
781 gcaaggttaa aactcaagg aattgacggg gcccgcaca agcggtagag catgtggtt
841 aattcgaagc aacgcgaga accttaccaa ccttgatcat ggcgatcgc gttccagaga
901 tggttccttc agttcgctg gatcgacac aggtgctgca tggtgtcgt cagctcgtg
961 cgtgatggt tcggttaagt cgggcaacga gcgcaaccca cgtccttagt tgccagcatt
1021 cagttgggca ctctaggaa actgcccgtg ataagccgga ggaaggtgtg gatgacgtca
1081 agtccatag gcccttacgg gttgggctac mcactgcta caatggcagt gacaatgggt
1141 taatcccaaa aagctgtctc agttcgatt ggggtctgca actgacccc atgaagctgg
1201 aatcgtagt aatcgtgaa cagcatgac ggtgaaatc gttccgggc cttgtacaca
1261 ccgcccgtca caccatgga attggttcta cccgaaggcg gtcgccaac ctcgcaagag
1321 gaggcga

```

Hình 4. Trình tự gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn là *Rhodobacter sphaeroides* ND42 trên GenBank

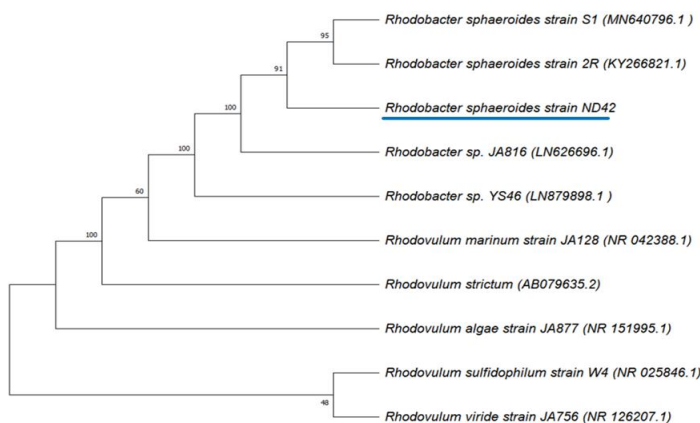
DNA tổng số từ chủng ND42 được điện di để kiểm tra trên gel agarose 1% thu được bằng DNA sắc nét, có hàm lượng đủ để tiến hành phản ứng PCR nhân gene 16S rRNA (Hình 3A). Gene 16S rRNA được phân lập từ DNA tổng số sử dụng cặp mồi đặc hiệu và sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 1,5 kb theo như dự đoán (Hình 3B). Gene 16S rRNA được giải trình tự có kích thước 1327 nucleotide (Hình 4) và được đăng ký trên GenBank với mã số PP702412.

Kết quả phân tích bằng phần mềm BLAST trong NCBI cho thấy, gene 16S rRNA của chủng ND42 có độ tương đồng hơn 99% so với loài đã công bố trên GenBank (Hình 5).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cereibacter sphaeroides strain ND42 16S ribosomal RNA gene, partial sequ...	Cereibacte...	2447	2447	100%	0.0	100.00%	1327	PP702412.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cereibacter sphaeroides strain CH10 chromosome 2, complete sequence	Cereibacte...	2444	4888	99%	0.0	99.92%	946996	CP051469.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cereibacter sphaeroides strain CH10 chromosome 1, complete sequence	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	3190151	CP051468.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cereibacter sphaeroides strain DSM 158 chromosome 1, complete sequence	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	3190321	CP047031.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sphaeroides strain S1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	1337	MN640796.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sphaeroides strain YLL-13 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	1428	MN625849.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sphaeroides strain P230(7) 16S ribosomal RNA gene, partial se...	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	1425	MN605654.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sphaeroides strain Z08 16S ribosomal RNA gene, partial sequ...	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	1459	MN605651.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cereibacter sphaeroides 2_4_1 chromosome 2, complete sequence	Cereibacte...	2444	4888	99%	0.0	99.92%	942894	CP030272.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cereibacter sphaeroides 2_4_1 chromosome 1, complete sequence	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	3188530	CP030271.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sphaeroides strain MBTL-J-20 chromosome 2, complete sequence	Cereibacte...	2444	4888	99%	0.0	99.92%	942922	CP015288.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sphaeroides strain MBTL-J-20 chromosome 1, complete sequence	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	3188516	CP015287.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sphaeroides strain 2R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	1410	KY266821.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cereibacter sphaeroides strain MBTL-J-13 chromosome 2, complete sequence	Cereibacte...	2444	4888	99%	0.0	99.92%	942948	CP015211.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cereibacter sphaeroides strain MBTL-J-13 chromosome 1, complete sequence	Cereibacte...	2444	2444	99%	0.0	99.92%	3188543	CP015210.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sphaeroides strain MBTL-J-8 chromosome 2, complete sequence	Cereibacte...	2444	4888	99%	0.0	99.92%	942876	CP012961.1

Hình 5. Kết quả phân tích tương đồng gene 16S rRNA phân lập từ chủng ND42 với các trình tự đã công bố trên GenBank bằng BLAST trong NCBI

Bằng phần mềm MEGA 11, gene 16S rRNA từ chủng ND42 và một số loài đã công bố trên GenBank để xây dựng cây phát sinh chủng loại (Hình 6) cho thấy, chủng ND42 nằm cùng nhánh với các loài thuộc chi *Rhodobacter* và có độ tương đồng 99,92% so với loài *Rhodobacter sphaeroides* được đối chiếu trên GenBank có mã số MN640796.1; MN625849.1; MN605654.1; KY266821.1. Như vậy, chủng VKTQH ND42 được xác định là chủng vi khuẩn *Rhodobacter sphaeroides* ND42.



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại gen 16A rRNA của VKTQH với một số loài trên GenBank

4. Kết luận

Chủng VKTQH ND42 phân lập có khả năng đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đường kính vòng kháng khuẩn là $14,66 \pm 0,31$ mm và có khả năng sinh 2 loại enzyme gelatinase, proteinase với đường kính vòng phân giải lần lượt là: $3,38 \pm 0,64$ mm và $5,23 \pm 1,40$ mm. Gene 16S rRNA từ chủng ND42 được phân lập có kích thước 1327 nucleotide, được đăng ký trên GenBank với mã số PP702412 và dựa trên trình tự gene 16S rRNA chủng ND42 được đặt tên là *Rhodobacter sphaeroides* ND42.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện bằng kinh phí của Đề tài “Nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học từ các chủng vi khuẩn tía quang hợp bản địa để cải thiện chất lượng nước, bổ sung dinh dưỡng và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*)”, mã số: ĐTĐL.CN-101/21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. Thanh, “Total seafood production in 2023 is estimated to reach over 9,312 thousand,” Directorate of fisheries, January 17, 2024. [Online]. Available: <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn>. [Accessed Apr. 16, 2024].
- [2] L. Tran *et al.*, “Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 105, no. 1, pp. 45-55, Jul. 2013, doi: 10.3354/dao02621.
- [3] S. Panwichian, D. Kantachote, B. Wittayaweerarak, and M. Mallavarapu, “Factors affecting immobilization of heavy metals by purple nonsulfur bacteria isolated from contaminated shrimp ponds,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 12, pp. 2199-2210, Dec. 2010, doi: 10.1007/s11274-010-0405-8.
- [4] F. Egger, T. Hülsen, S. Tait, and D. J. Batstone, “Autotrophic sulfide removal by mixed culture purple phototrophic bacteria,” *Water Res.*, vol. 182, Sep. 2020, Art. no. 115896, doi: 10.1016/j.watres.2020.115896.
- [5] N. Rashid, M. N. A. Abdelnabi, A. S. Vincent, and H. R. Mackey, “Simultaneous treatment of fruit juice industry wastewater and single-cell protein synthesis using purple non-sulfur bacteria,” *Biomass Convers. Biorefinery*, vol. 13, no. 18, pp. 16321-16332, Dec. 2023, doi: 10.1007/s13399-022-03669-6.
- [6] Z. W. LaTurner, G. N. Bennett, K.-Y. San, and L. B. Stadler, “Single cell protein production from food waste using purple non-sulfur bacteria shows economically viable protein products have higher environmental impacts,” *J. Clean. Prod.*, vol. 276, Dec. 2020, Art. no. 123114, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.123114.
- [7] O. Z. Wada, A. S. Vincent, and H. R. Mackey, “Single-cell protein production from purple non-sulphur bacteria-based wastewater treatment,” *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 21, no. 4, pp. 931-956, Dec. 2022, doi: 10.1007/s11157-022-09635-y.
- [8] S. Torpee, D. Kantachote, A. Sukhoom, and M. Tantirungkij, “Culture optimization to enhance carotenoid production of a selected purple nonsulfur bacterium and its activity against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 69, no. 6, pp. 2422-2436, 2022, doi: 10.1002/bab.2292.
- [9] A. Koga, M. Goto, S. Hayashi, S. Yamamoto, and H. Miyasaka, “Probiotic Effects of a Marine Purple Non-Sulfur Bacterium, *Rhodovulum sulfidophilum* KKM101, on Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*),” *Microorganisms*, vol. 10, no. 2, Feb. 2022, Art. no. 2, doi: 10.3390/microorganisms10020244.
- [10] H. Miyasaka, A. koga, and T. Maki, “Recent progress in the use of purple non-sulfur bacteria as probiotics in aquaculture,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 6, p. 145, Apr. 2023, doi: 10.1007/s11274-023-03592-6.
- [11] A. Kumar, “Studies on purple non sulfur bacteria from shrimp ponds and their potential applications,” *INFLIBNET*, 2012. [Online]. Available: <https://shodhganga.inflibnet.ac.in:8443/jspui/handle/10603/9637>. [Accessed Apr. 25, 2024].
- [12] A. Alloul, M. Wille, P. Lucenti, P. Bossier, G. Van Stappen, and S. E. Vlaeminck, “Purple bacteria as added-value protein ingredient in shrimp feed: *Penaeus vannamei* growth performance, and tolerance against *Vibrio* and ammonia stress,” *Aquaculture*, vol. 530, Jan. 2021, Art. no. 735788, doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735788.
- [13] S. Chumpol, D. Kantachote, T. Nitoda, and H. Kanzaki, “The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cultivation,” *Aquaculture*, vol. 473, pp. 327-336, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.02.033.
- [14] U. T. T. Do, Y. T. Hoang, L. T. Do, and N. V. Tran, “Study on photosynthetic bacteria as living feed in aquaculture breeding,” *Journal of Biotechnology*, vol. 12, pp. 41-45, 2009.
- [15] L. T. Do, “Study on application of purple photosynthetic bacteria for removal of sulfide from wastewater,” PhD Thesis, Vietnam National University, 2016.
- [16] Y. T. Hoang, “Study on purple nonsulfur bacteria isolated in Vietnam for use in aquaculture,” PhD Thesis, Vietnam National University, Hanoi, 2010.

CHŨNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP *RHODOVULUM SULFIDOPHILUM* ST20 CÓ TIỀM NĂNG SỬ DỤNG LÀM PROBIOTIC TRONG NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*LITOPENAEUS VANNAMEI*)

Trần Thu Hà^{1,2*}, Phạm Thanh Trang¹, Đinh Thị Thu Hằng², Nguyễn Thị Thu Huyền³, Hoàng Thị Yên¹

¹Viện Công sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên

TÓM TẮT

Vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) đã được ứng dụng trong một số lĩnh vực của cuộc sống như: sử dụng làm nguyên liệu để tách chiết các hoạt chất sinh học có giá trị (ubiquinol, carotenoid, acid béo không no...), sử dụng làm thức ăn trong chăn nuôi gia súc, gia cầm và nuôi trồng thủy sản, sử dụng để xử lý các nguồn nước thải khác nhau... Ngoài ra, hiện nay nhiều nghiên cứu cũng đã tiến hành sàng lọc và tuyển chọn các chủng VKTQH có tiềm năng sử dụng làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản. Trong bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu về chủng VKTQH có ký hiệu ST20 có tiềm năng sử dụng làm probiotic trong nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Chủng VKTQH ST20 vừa có khả năng đối kháng với vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt đạt $10,89 \pm 1,04$ mm và $5,95 \pm 1,10$ mm, đồng thời có khả năng sinh tổng hợp 3 loại enzyme protease, lipase và amylase với đường kính vòng phân giải lần lượt là $11,12 \pm 1,22$ mm; $7,39 \pm 0,85$ mm và $4,08 \pm 0,32$ mm. Ngoài ra, chủng ST20 có khả năng tự kết dính và tạo màng biofilm. Bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng ST20 có độ tương đồng 100% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum*. Do vậy, chủng VKTQH ST20 có thể thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum* và được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* ST20.

Từ khóa: Enzyme, *Rhodovulum sulfidophilum*, vi khuẩn tía quang hợp, probiotic, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*.

MỞ ĐẦU

Nuôi tôm thẻ chân trắng (TTCT) là một trong những hoạt động mang lại hiệu quả kinh tế cao. Theo báo cáo Tổng cục Thủy sản, năm 2023 sản lượng tôm đạt 1,21 triệu tấn, tăng 5,8% so với năm 2022, trong đó theo số liệu thống kê tính đến tháng 8/2023 sản lượng TTCT xuất khẩu của Việt Nam đạt 29.004 tấn tăng 39% so với cùng kỳ năm 2022.

Tuy nhiên, việc nuôi tôm thâm canh ở quy mô công nghiệp đang gặp nhiều khó khăn do ô nhiễm nguồn nước bởi mật độ nuôi thả cao dẫn đến dịch bệnh trên tôm phát triển nhanh chóng. Nhìn chung, các bệnh trên tôm thường do nhiễm vi khuẩn, đặc biệt là nhóm vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra, điển hình là các loài *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (Chatterjee and Haldar, 2012). Một số bệnh phổ biến trong nuôi tôm như: bệnh đốm trắng, bệnh chậm lớn, bệnh phân trắng... và đặc biệt nghiêm trọng, gây thiệt hại kinh tế nhiều nhất là bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND). Để giải quyết vấn đề này, hóa chất và kháng sinh được sử dụng để cải thiện chất lượng nước nuôi và loại bỏ mầm bệnh trên tôm. Tuy nhiên, việc này đã gây tác dụng xấu cho sức khỏe người tiêu dùng, đặc biệt việc sử dụng kháng sinh trong thời gian dài dẫn đến chúng tích tụ trong sản phẩm và gia tăng các gen kháng kháng sinh ở nhóm vi khuẩn gây bệnh (Chumpol et al., 2017). Do vậy, việc sử dụng các chế phẩm sinh học thân thiện với môi trường hiện nay rất được quan tâm trong nuôi tôm như: probiotic, prebiotic, symbiotic và các peptide kháng khuẩn.

Trong số các nhóm vi sinh vật thường được sử dụng làm chế phẩm sinh học như: *Bacillus*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Lactobacillus*, *Propiobacterium*... vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) là một trong những nhóm có nhiều tiềm năng ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng như: Xử lý COD, BOD, H₂S, NO_x, kim loại nặng, thúc đẩy khả năng tăng trưởng và nâng cao chất lượng tôm nuôi bằng cách tiết ra các hợp chất có hoạt tính sinh học như chất kháng khuẩn, các enzyme tiêu hóa thức ăn (proteinase, amylase, cellulase...), vitamin B12... để kiểm soát mầm bệnh trên tôm (Miyasaka et al., 2023; Koga et al., 2022; Chumpol et al., 2017).

Ở Việt Nam, những nghiên cứu ứng dụng VKTQH làm chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản mà đặc biệt sử dụng làm probiotic trong nuôi TTCT còn rất hạn chế. Vì vậy, trong nghiên cứu này trình bày kết quả xác định một số đặc tính probiotic và định danh đến loài chủng VKTQH tiềm năng này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng VKTQH ST20 được phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng trong ao nuôi tôm tại ấp Tổng Cán, xã Liêu Tú, tỉnh Sóc Trăng. Khuẩn lạc của chủng ST20 có dạng hình tròn, lồi, màu đỏ nâu, đường kính khoảng 1,4-1,6 mm. Dịch huyền phù tế bào có màu đỏ nâu. Tế bào có dạng hình trứng, đường kính khoảng 0,66 - 1,07 μm , sinh sản bằng cách nhân đôi, tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào. Chủng ST20 sinh trưởng tốt trong môi trường GA ở nồng độ NaCl: 15 g/L; pH: 6,5-7; 30-32°C, ánh sáng 5.000 lux.

Chủng vi khuẩn kiểm định *Vibrio parahaemolyticus* BLV10 (*V. parahaemolyticus*): được phân lập, sàng lọc và lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chủng chuẩn *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*): nhận được từ Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy VKTQH

VKTQH được nuôi trong bình thể tích 100 mL (chứa 90 mL) môi trường GA lỏng, bổ sung giống 10%, bổ sung NaCl 15 g/L, nhiệt độ 30-32°C, ánh sáng khoảng 5.000 lux đậy kín bằng nút cao su để hạn chế oxy xâm nhập. Sau 2 ngày (mật độ khoảng 5.10^8 tế bào/ml); 4 và 7 ngày (mật độ khoảng 10^9 tế bào/ml) tiến hành thu dịch nuôi sử dụng để tiến hành các thí nghiệm.

Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn kiểm định

Các chủng vi khuẩn kiểm định *Vibrio* được nuôi trong môi trường TSB lỏng (có bổ sung NaCl 15 g/L) nuôi ở nhiệt độ phòng, lắc 150 vòng/phút. Sau 18h nuôi cấy, dịch nuôi của 2 loài vi khuẩn kiểm định trên được điều chỉnh mật độ $OD_{660}=0,1$.

Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn (Chumpol et al., 2017)

Sau 7 ngày nuôi cấy VKTQH trong môi trường GA lỏng tiến hành ly tâm để loại tế bào, cô đặc dịch bằng cách đông khô, sau đó hòa tan dịch đã đông khô bằng metanol 10% để thu được nồng độ dung dịch đậm đặc gấp 20 lần so với dịch nuôi ban đầu. Hút 50 μL dịch nuôi cấy vi khuẩn kiểm định trang đều trên bề mặt đĩa thạch TSA (1,5% NaCl), sau đó tiến hành đục giếng thạch. Hút 120 μL dịch VKTQH đã được cô đặc nhỏ vào từng giếng, ủ ở 35°C trong 18h. Khả năng đối kháng của VKTQH với vi khuẩn kiểm định được xác định thông qua đường kính vòng kháng khuẩn.

Phương pháp xác định khả năng sinh enzyme (Chumpol et al., 2017)

Sau 2 ngày nuôi cấy VKTQH Sử dụng môi trường GA có bổ sung các cơ chất gelatin, casein, tinh bột tan, CMC và tributyrin để tiến hành xác định khả năng sinh các loại enzyme gelatinae, protease, amylase, cellulase và lipase tương ứng. Tiến hành đục giếng thạch, hút 50 μL dịch nuôi cấy VKTQH nhỏ vào từng giếng. Nuôi cấy các đĩa trong điều kiện hiếu khí - tối, nhiệt 30-32°C, trong 5 ngày. Khả năng sinh enzyme được xác định thông qua đường kính vòng phân giải cơ chất.

Phương pháp xác định khả năng tự kết dính (Trinh Thị Phương Thảo et al., 2023)

Sau 4 ngày nuôi cấy VKTQH trong môi trường GA ở 30-32°C tiến hành ly tâm ở 8.000 vòng/15 phút để thu sinh khối. Tiếp theo tiến hành rửa sinh khối bằng đệm phosphat (pH 7.2). Sinh khối sau đó được tái huyền phù lại bằng đệm phosphat để được mật độ cuối cùng $OD_{660} = 0,5$. Cuối cùng, phân chia dịch tái huyền phù này vào các lọ peniciline 13 mL (chứa 10 mL dịch), lắc trong 10 giây và để lắng ở 37°C trong 5 giờ. Sau 5 giờ tiến hành đo dịch nuôi ở bước sóng OD_{660} ở các thời điểm 0 và 5 giờ. Tỷ lệ kết dính (%) được tính bằng công thức: $(1 - At/Ao) \times 100$. Trong đó: At và Ao là OD_{660} tại thời điểm 5 giờ và 0 giờ.

Phương pháp xác định khả năng tạo màng Biofilm (Nguyễn Thị Minh Nguyệt et al., 2020)

Sau 4 ngày nuôi cấy VKTQH trên môi trường GA dịch tiến hành ly tâm 3 lần liên tiếp ở 4.000 vòng/phút trong vòng 10 phút ở 4°C và rửa lại bằng nước cất 2 lần với thể tích tương ứng để thu sinh khối. Sau lần ly tâm cuối cùng tiến hành hòa lại sinh khối bằng nước cất vô trùng và điều chỉnh về nồng độ $OD_{660} = 0,5$. Cuối cùng hút 100 μL dịch trên cho vào các ống eppendorf 1,5 mL chứa 900 μL môi trường GA. Mẫu được nuôi tĩnh dưới bóng đèn sợi đốt 60W, nhiệt độ 30-32°C. Sau 7 ngày tiến hành xác định khả năng tạo màng sinh học của VKTQH. Dùng pipetman hút dịch nuôi cấy nhẹ để không làm vỡ màng, rửa nhẹ màng sinh học bằng 1 mL nước cất, hút loại nước, lặp lại lần tiếp theo. Cho 1 mL dung dịch tím tinh thể 0,1% vào các ống eppendorf, ủ 10 phút để cố định. Hút bỏ dung dịch tím tinh thể, rửa liên tiếp 2 lần bằng nước cất (1mL/lần). Sau đó bổ sung 1 mL axit axetic 33%, đảo trộn hỗn hợp này, pha loãng tới hạn và đo bước sóng 570 nm. Mật độ tế bào trong màng VKTQH được xác

định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm. Ống eppendorf không chứa sinh khối VKTQH được sử dụng làm đối chứng âm.

Phương pháp định danh vi khuẩn sử dụng gene 16S rRNA (Kumar, 2012)

Sau 4 ngày nuôi cấy VKTQH trong môi trường GA tiến hành thu sinh khối bằng cách ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút. DNA bộ gen được tách chiết và tinh sạch bằng kit Gen JET (Thermo). Sử dụng cặp mồi F1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và R1 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') do Devereus và cộng sự thiết kế để khuếch đại gene 16S rRNA. Quá trình PCR được thực hiện theo Kumar (2012) và giải trình tự theo phương pháp sử dụng các dideoxynucleotide của Sanger bằng máy giải trình tự gen tự động.

Phương pháp xây dựng cây phân loại

Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với các trình tự đã được công bố trên GenBank bằng chương trình BLAST để định danh loài vi khuẩn. Sử dụng phần mềm Mega 11 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của VKTQH với các loài gần gũi.

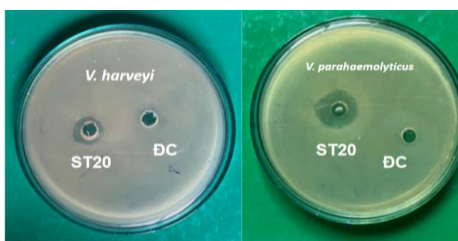
Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm nêu trên được tiến hành 3 lần độc lập. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (TB \pm SD). Tính toán số liệu được thực hiện bằng phần mềm Microsoft Excel phiên bản 2019.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả đối kháng của chủng VKTQH ST20 với vi khuẩn kiểm định *V. paraheamolyticus* và *V. harveyi*

Một trong những đặc tính quan trọng nhất làm căn cứ để tuyển chọn các chủng vi khuẩn làm probiotic là khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh trên tôm. Do vậy, trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để xác định khả năng đối kháng của chủng VKTQH ST20 với 2 loại vi khuẩn kiểm định (*V. paraheamolyticus* và *V. harveyi*). Kết quả được trình bày ở hình 1.

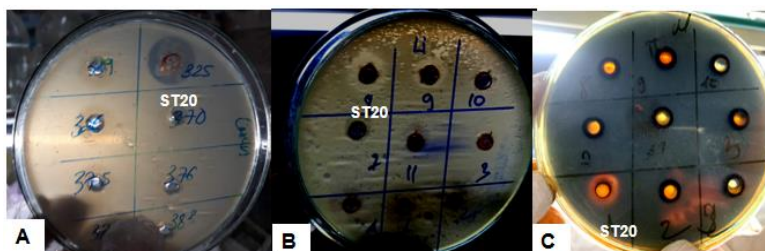


Hình 1. Kết quả đối kháng của chủng VKTQH ST20 với 2 loài vi khuẩn kiểm định *V. harveyi* (Hình A) và vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Hình B)

Từ Hình 1 cho thấy, chủng ST20 có khả năng đối kháng với cả 2 loài vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn là $10,89 \pm 1,04$ mm và *V. harveyi* với đường kính vòng kháng khuẩn là $5,95 \pm 1,10$ mm.

Kết quả sinh enzyme của chủng VKTQH ST20

Hiệu quả của chế phẩm probiotic không chỉ ở hoạt tính kháng khuẩn mà còn phụ thuộc rất nhiều vào khả năng sinh enzyme tiêu hoá thức ăn của các chủng vi sinh vật. Trong thí nghiệm này sử dụng môi trường GA và bổ sung các cơ chất: gelatin, casein, tinh bột tan, CMC và tributyrin để xác định khả năng sinh các enzyme của chủng ST20 tương ứng gelatinase, protease, amylase, cellulase và lipase. Kết quả sau 5 ngày nuôi cấy cho thấy chủng ST20 có khả năng sinh 3 loại enzyme: protease, lipase và amylase với đường kính vòng phân giải lần lượt là $11,12 \pm 1,22$ mm; $7,39 \pm 0,85$ mm và $4,08 \pm 0,32$ mm tương ứng (Hình 2).



Hình 2. Khả năng sinh enzyme protease (A), lipase (B) và amylase (C) của chủng VKTQH ST20

Như vậy, chủng VKTQH ST20 trong thí nghiệm này vừa có khả năng đối kháng với 2 loài vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là $10,89 \pm 1,04$ mm và $5,95 \pm 1,10$ mm

đồng thời có khả năng sinh tổng hợp 3 loại enzyme protease, lipase và amylase với đường kính vòng phân giải lần lượt là 11,12±1,22 mm; 7,39±0,85 mm và 4,08±0,32 mm tương ứng.

Theo Chumpoll và cộng sự (2017) khi tiến hành nghiên cứu khả năng kháng khuẩn và khả năng sinh enzyme của các chủng VKTQH phân lập từ ao nuôi tôm ở một số tỉnh Thái Lan. Trong thí nghiệm này nhóm nghiên cứu cũng tiến hành ly tâm, cô đặc dịch VKTQH bằng đông khô, kết quả cho thấy chủng VKTQH TKW17 có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 13,21 mm và *V. harveyi* với đường kính 17,13 mm. Đồng thời, chủng TKW17 cũng có khả năng sinh tổng hợp enzyme gelatinase với đường kính phân giải cơ chất 9,93mm (Chumpol et al., 2017).

Natchapat và cộng sự (2018) cũng đã tuyển chọn được chủng *R. sulfidophilum* PS342 có tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm sinh học trong nuôi tôm bởi chủng PS342 vừa có khả năng sinh tổng hợp enzyme gelatinase và vừa có khả năng đối kháng với 3 loài vi khuẩn *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* (Natchapat et al., 2018).

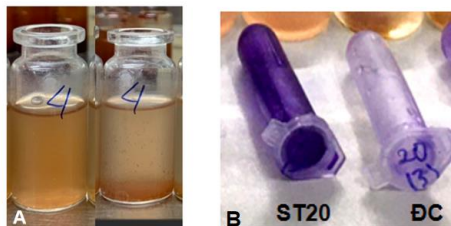
Kết quả tự kết dính và tạo màng biofilm của chủng VKTQH ST20

Đỗ Thị Bích Thủy và Nguyễn Thị Diễm Hương (2018) đã tiến hành xác định khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn sử dụng làm probiotic với 2 hoặc 3 tiêu chí: tự kết dính, đồng kết dính và bám dính với đường ruột của vật chủ (Đỗ Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Diễm Hương, 2018). Tuy nhiên, gần đây cũng có một số tác giả đã sử dụng biofilm để xác định khả năng bám dính của các chủng vi sinh vật (Bùi Thị Việt Hà, 2021). Do vậy, trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành xác định khả năng bám dính của chủng VKTQH ST20 dựa vào 2 tiêu chí: tự kết dính và tạo màng biofilm.

Khi các tế bào vi khuẩn tự kết dính lại với nhau sẽ tạo thành những hạt có kích thước lớn hơn và lắng xuống trong dung dịch. Vì vậy, theo thời gian, mật độ tế bào của dịch vi khuẩn giảm đi và mức độ giảm này phản ánh tỷ lệ đã kết dính.

Để đánh giá khả năng tạo màng biofilm của chủng VKTQH ST20, tiến hành theo phương pháp nhuộm tím tinh thể giúp phát hiện ra các tế bào bám dính trong một màng sinh học trên bề mặt giá thể đồng thời cũng cho phép định lượng mức độ hình thành màng sinh học mạnh hay yếu trong một khoảng thời gian nhất định. Chỉ số OD₅₇₀ đo lượng tím tinh thể bắt màu với tế bào và biểu thị mật độ tế bào sống trong màng sinh học. Do vậy chỉ số OD₅₇₀ càng cao chứng tỏ mật độ vi khuẩn trong màng sinh học càng nhiều và ngược lại. Kết quả khả năng tự kết dính của chủng VKTQH ST20 được mô tả ở hình 3A và tạo màng biofilm được mô tả ở hình 3B.

Trước Sau



Hình 3. Khả năng tự kết dính (A) và tạo màng biofilm (B) của chủng VKTQH ST20

Từ hình 3A cho thấy chủng ST20 có khả năng tự kết dính với % kết dính là 40,60% (ΔOD_{660} sau 5h đạt $0,297 \pm 0,013$). Từ hình 3B cho thấy màu sắc tím kết tinh xuất hiện trên thành ống của chủng ST20 đậm màu. Do vậy chủng ST20 có khả năng tạo màng biofilm cao với giá trị ΔOD_{570} nm đạt $7,674 \pm 0,017$.

Nguyễn Thị Minh Nguyệt và cộng sự (2020) đã sàng lọc 3 chủng VKTQH ký hiệu là DQ41, PY6, PY9 có khả năng tạo màng sinh học cao nhất với giá trị OD₅₇₀ = 7. So sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, khả năng tạo màng biofilm của chủng ST20 có giá trị OD₅₇₀ = 7,674 nm, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Nguyệt và cộng sự (2020).

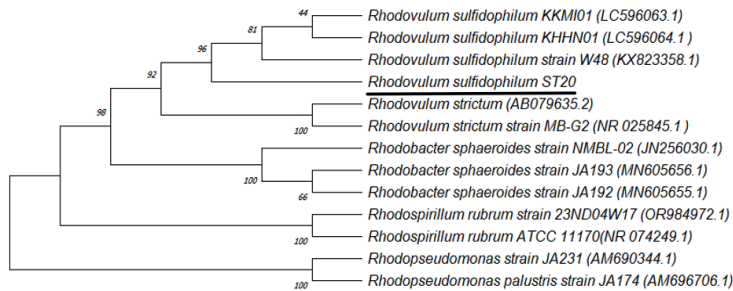
Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA

DNA tổng số của chủng ST20 sau khi được tách chiết bằng bộ kit Gen JET (Thermo) được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả thu được băng DNA sắc nét. Sau đó, Gen 16s rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu do Devereus thiết kế và sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 1,5 kb phù hợp với dự đoán. Tiến hành giải trình tự gene 16S rRNA và thu được trình tự nucleotide của chủng ST20 (Hình 4).

TGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGTCGTGAAGATAATGACGGTAGCGACAGA
 AGAAGCCCCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTCGGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCGGAACTGCCTCCGAT
 ACTGGTAGTCTAGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGG
 AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGCTGATACCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCCGCAAGCATGCTTGTCCGTTGACACAC
 CTAACGGATTAAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCTTGACATCCTGATCGCG
 GTTACCCGAGAGGGTTTCTTCAGTTCGGCTCGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGTCGTGTC
 GTGAGATGTTCCGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCT
 AAGAGAATGCCGATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGC
 TACACACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCAAAAACCTGTCTCAGTTCGGATTCTCTCGCA
 ACTCGAGAGCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
 GTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGGTTACCCGAAGACGGTGCGCCAACCCCTTA

Hình 4. Trình tự gene 16S rRNA của chủng VKTQH ST20

Gene 16S rRNA của chủng ST20 được so sánh với một số loài đã công bố trên GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA 11 (Hình 5). Kết so sánh với các trình tự gen trên ngân hàng gen Bank và cây phát sinh chủng loại hình 5, chủng ST20 nằm cùng nhánh với các loài thuộc chi *Rhodovulum* và có độ tương đồng 100% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum* có mã số trên GenBank là KX823358.1 và LC596063. Như vậy, chủng VKTQH ST20 có thể thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum* và được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* ST20.



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của một số loài VKTQH

KẾT LUẬN

Chủng VKTQH ST20 có khả năng đối kháng với vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt đạt 10,89±1,04 mm và 5,95±1,10 mm đồng thời có khả năng sinh 3 loại enzyme protease, lipase và amylase với đường kính vòng phân giải: 11,12±1,22 mm; 7,39±0,85 mm và 4,08±0,32 mm tương ứng. Ngoài ra, chủng ST20 có khả năng tự kết dính với % kết dính là 40,60% và tạo màng biofilm với $\Delta OD_{570\text{ nm}} = 7,674 \pm 0,017$.

Bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng ST20 có độ tương đồng 100% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum*. Do vậy, chủng VKTQH ST20 có thể thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum* và được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* ST20.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện bằng kinh phí của Đề tài “Nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học từ các chủng vi khuẩn tía quang hợp bản địa để cải thiện chất lượng nước, bổ sung dinh dưỡng và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*)”, mã số: ĐTDL.CN-101/21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Thị Việt Hà (2021). Nghiên cứu công nghệ sản xuất một số chế phẩm probiotic từ một số loài *Lactobacillus* sp. và *Bacillus* sp. Báo cáo tổng kết đề tài, Bộ Công Thương.
- Chatterjee S, Haldar S (2013). *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *Journal of Marine Science, Research & Development* 3: 1–7.
- Chumpol S, Kantachot D, Rattanachua P, Uddhakul V, Nitoda T, Kanzaki H (2017). In vitro and in vivo selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: acute hepatopancreatic necrosis disease-causing. *Aquaculture*, 473: 327–336.
- Đỗ Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Diễm Hương (2018). Xác định khả năng chịu mặn và một số tính chất có tiềm năng probiotic của các chủng vi khuẩn lactic thuộc loài *Lactobacillus fermentum* phân lập từ ruột cá nục (*decaapterus lajanga*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế* 2.2: 799–806.
- Koga A, Goto M, Hayashi S, Yamamoto S, Miyasaka H (2022). Probiotic Effects of a Marine Purple Non-Sulfur Bacterium, *Rhodovulum sulfidophilum* KKMI01, on Kuruma Shrimp. *Marsupenaeus japonicus Microorganisms*, 10: 244.
- Kumar A (2012). *Studies on purple non sulfur bacteria from shrimp ponds and their potential applications. PhD thesis.*

Miyasaka, H, koga A, Maki (2023). Recent progress in the use of purple non-sulfur bacteria as probiotics in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 39:145.

Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Hoàng Phương Hà, Đồng Văn Quyền, Nguyễn Ngọc Hương Trà, Lê Thị Nhi Công (2020). Đánh giá khả năng phân hủy naphthalene và pyrene của một số chủng vi khuẩn tía quang hợp tạo màng sinh học. *Tạp Chí Công Nghệ Sinh Học* 18(3): 561–570.

Seangtumnor N, Kantachote D, Nookongbut P, Sukhoom A (2018). The potential of selected purple nonsulfur bacteria with ability to produce proteolytic enzymes and antivibrio compounds for using in shrimp cultivation. *Biocatal agric biotechnol*, 14: 138–144.

Trịnh Thị Phương Thảo, Lê Thị Kim Thoa, Bùi Thị Khuyên, Nguyễn Thị Minh Nga, Trương Thị Phương Lan, Vũ Đức Hoàng, Nguyễn Đức Huy (2022). Khả năng kháng *Vibrio* spp. và đặc tính probiotic của *Lactobacillus farciminis* HN12. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Kỹ thuật và Công nghệ*, 131: 89–102.

PURPLE NONSULFUR BACTERIUM *RHODOVULUM SULFIDOPHILUM* ST20 HAS THE POTENTIAL OF USING AS PROBIOTIC IN FACIFIC WHITE SHRIMP (*LITOPENAEUS VANNAMEI*)

Tran Thu Ha^{1,2*}, Pham Thanh Trang¹, Dinh Thi Thu Hang², Nguyen Thi Thu Huyen³, Hoang Thi Yen¹

¹*Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Sciences and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology*

³*TNU – University of Sciences*

SUMMARY

Purple nonsulfur bacteria (PNSB) has many biotechnological applications, such as using raw material for extracting valuable biological compounds (ubiquinol, carotenoids, unsaturated fatty acids...), food for cattle, poultry and aquaculture, treatment various of wastewater sources... In addition, nowadays PNSB have been screened and selected for using as probiotic in aquaculture. In this study the results of the strain PNSB ST20 that has potential of using as a probiotic in facific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was shown. ST20 strain can inhibit not only both *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*, which causes acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) with an inhibition zone diameter of 10.89 ± 1.04 mm and 5.95 ± 1.10 mm but also capable of producing 3 enzymes protease, lipase and amylase with clear zones diameters of 11.12 ± 1.22 mm; 7.39 ± 0.85 mm and 4.08 ± 0.32 mm, respectively. More over strain ST20 has autoaggregation activity (40.60%) and creates biofilm ($\Delta OD_{570} \text{ nm} = 7.674 \pm 0.017$). Using the 16S rRNA gene sequencing, strain ST20 may belong to the species *Rhodovulum sulfidophilum* and was named *Rhodovulum sulfidophilum* ST20.

Keywords: Enzyme, *Rhodovulum sulfidophilum*, Purple nonsulfur bacteria, probiotic, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*.

* Author for correspondence: Tel: +84-0912543265; Email: hoangyen.ibt@gmail.com