

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 đầy 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: $(1 - \text{At}/\text{Ao}) \times 100$. 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.

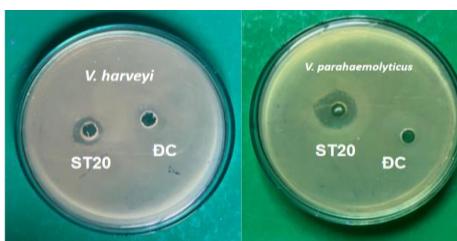
Phương pháp xử lý số liệu

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.

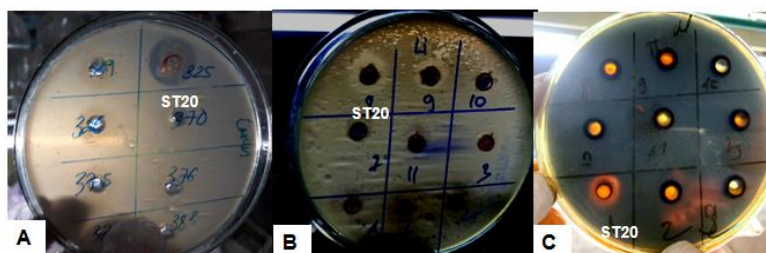


Hình 1. Kết quả đối kháng của chủng VKTQH ST20 với 2 loài vi khuẩn kiểm định *V. harveyi* (Hình A) và vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Hình B)

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 $11,12 \pm 1,22$ mm; $7,39 \pm 0,85$ mm và $4,08 \pm 0,32$ mm tương ứng.

Theo Chumpoll và đồng tác giả (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 với *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 đồng tác giả (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).

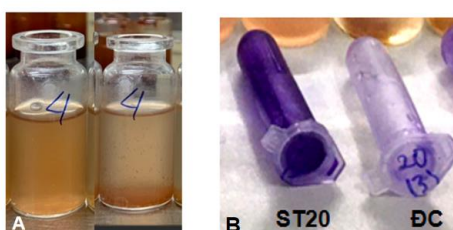
Kết quả tự kết dính và tạo màng biofilm của chủng VKTQH ST20

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 OD_{570} 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 OD_{570} 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 $OD_{570} = 7$. So sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, khả năng tạo màng biofilm của chủng ST20 có giá trị $OD_{570} = 7,674$ nm, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Nguyệt và đồng tác giả (2020).

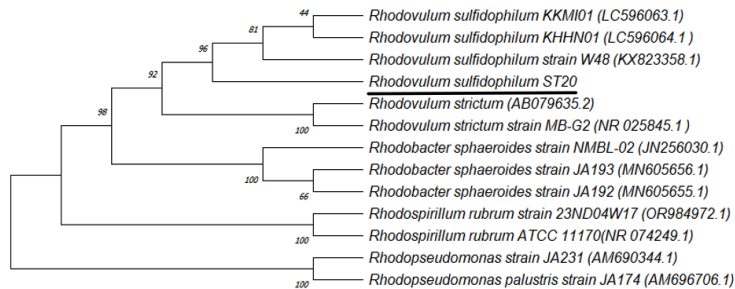
Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA

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
 AGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGCCGCGTAGGCGGACTATTAAGTCGGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCGGAACTGCCTCCGAT
 ACTGGTAGTCTAGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGG
 AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGCTCGATACGTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGCCAGTGTGCGCAAGCATGCTTGTCCGGTGACACAC
 CTAACGGATTAAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCTTGACATCCTGATCGCG
 GTTACCCGAGAGGGTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTGTGTC
 GTGAGATGTTCCGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTGTCCAGCATTGAGTTGGGCACTCT
 AAGAGAACTCCCGATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTACGGGTTACGGGTTGGGC
 TACACACGTGTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCAAAAACCTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCGCA
 ACTCGAGAGCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
 GTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTTTACCCGAAGACGGTGTGCGCAACCCCTTA

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 ΔOD_{570 nm} = 7,674±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 bán 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, 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. *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

¹Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology

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

³TNU – 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: +84-912543265; Email: hoangyen.ibt@gmail.com