

**PURPLE NONSULFUR BACTERIUM STRAIN *RHODOBACTER SPHAEROIDES* ISOLATED FROM NAM DINH SHRIMP POND CAPACITY PRODUCING ENZYMES AND ANTAGONISM TO *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS***Nguyen Thi Thu Huyen<sup>1</sup>, Pham Thanh Trang<sup>2</sup>, Dinh Thi Thu Hang<sup>3</sup>, Tran Thu Ha<sup>2,3</sup>, Hoang Thi Yen<sup>2\*</sup><sup>1</sup>TNU – University of Sciences, <sup>2</sup>Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology<sup>3</sup>Graduate University of Sciences and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<b>Received: 25/4/2024</b>	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.
<b>Revised: 31/5/2024</b>	
<b>Published: 06/6/2024</b>	
<b>KEYWORDS</b>	
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 Huyền<sup>1</sup>, Phạm Thanh Trang<sup>2</sup>, Đinh Thị Thu Hằng<sup>3</sup>, Trần Thu Hà<sup>2,3</sup>, Hoàng Thị Yến<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam<sup>3</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<b>Ngày nhận bài: 25/4/2024</b>	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.
<b>Ngày hoàn thiện: 31/5/2024</b>	
<b>Ngày đăng: 06/6/2024</b>	
<b>TỪ KHÓA</b>	
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](mailto: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 H<sub>2</sub>S, 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); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g/L); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,8 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 g/L); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2 g/L); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,053 g/L); vi lượng SL6<sup>(\*)</sup> (1 mL/L); dung dịch vitamin B<sub>12</sub><sup>(\*\*)</sup> (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: CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,25 g/L); CuCl<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,01 g/L); MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,07 g/L); ZnCl<sub>2</sub> (0,1 g/L); NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,01 g/L); Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,01 g/L); FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,8 g/L); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,5 g/L); Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,03 g/L); H<sub>2</sub>O 1 lít.

(\*\*) Dung dịch vitamin B<sub>12</sub> 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  $1 \times 10^5$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 gelatinae, 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'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') và mồi ngược R1 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') được thiết kế theo. Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng thể tích 25  $\mu$ l) gồm 12,5  $\mu$ l master mix; 1  $\mu$ l mồi mỗi loại (10 pmol); 1,0  $\mu$ l DNA khuôn; 9,5  $\mu$ 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

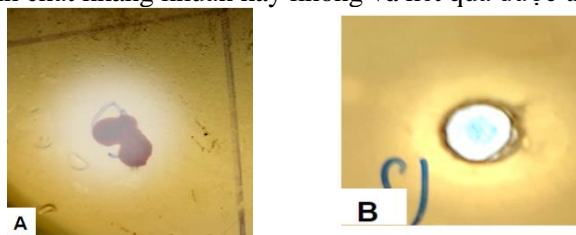
Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần độc lập. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (TB  $\pm$  SD). Tính toán số liệu được thực hiện bằng phần mềm Microsoft Excel phiên bản 2019.

### 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 ttgcttcgg aatgcccgg gaaactggg agtaatacgc aatgtccct ttgggggaaa
121 gatttatcg caaaggatcg gcccgcttg gattagtag ttggtgggt aatggcttac
181 caagccgacg atccatagct ggttgagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg
241 gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaactctaga caatgggagc aagcctgac
301 taagccatcc gcgtgatcga tgaagcctt aggttgtaa agatcttca ggtgggaaga
361 taatgacgtg accaccagaa gaagcccgg ctaactcgt gccagcagcc gcgtaaac
421 ggaaggggct agcgttattt ggaattactg ggcgtaaac gcactaggg ggcgtaaac
481 gtcagagggt aatcccagg gctcaacct ggaactgct ttgaaactcc cgaacttgag
541 gtcagagag gtgagtgaa ttccgagtg agagtgaaa ttctagata ttccgaggaa
601 caccagtgcc gaagcggct cactggctg atactgagc tgaggtgagc aagcgtggg
661 agcaaacagg attagatacc ctgtagtcc accgctaaa cpatgagtc cagctgcbg
721 gcagcatgct gttcgtgac acacctaagc gattaagcat tccgctggg gactcggcc
781 gcaaggttaa aactcaagg aattgacggg gcccgcaca agcgtgagc catgtggtt
841 aattcgaagc aagcgcaga accttaccac ccctgacat ggcgatcgc gttccagaga
901 tggttccttc agttcgctg gatcgacac aggtgctgca tgctgtcgt cagctcgtg
961 cgtgagatgt tcggttaagt cgggcaacga gcgcaaccca cgtccttagt tgccagcatt
1021 cagttgggca ctctaggaa actgcccgtg ataagccgga ggaaggtgtg gatgacgtca
1081 agtccatag gcccttacg gttggctac mcactgcta caatggcagt gacaatgggt
1141 taatcccaaa aagctgtctc agttcgatt ggggtctgca actgacccc atgaagcgg
1201 aatcgtagt aatcgtgaa cagcatgac cgtgtaaac gttccgggc cttgtacaca
1261 ccgccgta caccatgga attggttcta cccgaaggcg gtcgccaac ctgcgaagag
1321 gaggcga
    
```

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

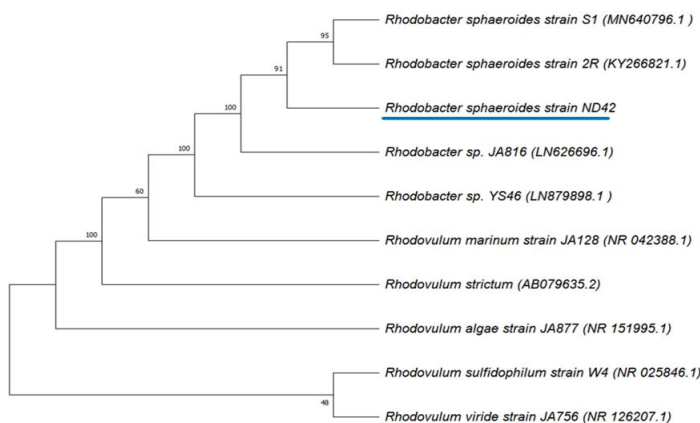
DNA tổng số từ chủng ND42 được điện di để kiểm tra trên gel agarose 1% thu được bằng DNA sắc nét, có hàm lượng đủ để tiến hành phản ứng PCR nhân gene 16S rRNA (Hình 3A). Gene 16S rRNA được phân lập từ DNA tổng số sử dụng cặp mồi đặc hiệu và sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 1,5 kb theo như dự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