

PHÂN LẬP VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP TỪ Bùn Đáy AO NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) TẠI TỈNH THỪA THIÊN - HUẾ

Nguyễn Ngọc Phước¹, Nguyễn Nam Quang¹, Nguyễn Đức Quỳnh Anh¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng chuyển hoá sulfide của vi khuẩn tia quang hợp phân lập từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại tỉnh Thừa Thiên - Huế. Trên môi trường DSMZ 27 lỏng, trong điều kiện kỵ khí đã tuyển chọn được 2 chủng có mức độ tích lũy sinh khối cao nhất, được ký hiệu DL11, PH21. Cả hai chủng này đều là vi khuẩn Gram âm, hình que, kết quả phân loại chủng DL11 là *Allochrochromatium* sp., và chủng PH21 là *Marichrochromatium* sp.. Các chủng này sinh trưởng và phát triển tốt ở nồng độ muối 10‰ - 20‰, pH: 6-7. Việc bổ sung cao nấm men vào môi trường nuôi cấy đã kích thích khả năng sinh trưởng của 2 chủng *Allochrochromatium* sp. và *Marichrochromatium* sp.. Ở điều kiện kỵ khí, cả 2 chủng đều có khả năng loại bỏ sulfide cao (94,4% sulfide khi nuôi ở môi trường chứa 10 - 20 mg/L sulfide).

Từ khóa: Ao nuôi tôm, môi trường DSMZ27, vi khuẩn tia quang hợp, *Allochrochromatium*, *Marichrochromatium*.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn quang hợp tía (Phototropic purple bacteria) là một nhóm vi sinh vật nhân sơ thuộc nhóm vi khuẩn Gram (-) [1,5]. Vi khuẩn quang hợp có khả năng phân giải NH₃ và H₂S dưới tác dụng ánh sáng mặt trời, trong điều kiện kỵ khí. Các chủng vi khuẩn này có thể sử dụng ánh sáng mặt trời ở độ sâu từ 80 - 100 m nhờ chứa nhiều sắc tố BChl_a trong tế bào nên có thể sử dụng để xử lý hàm lượng các khí độc NH₃ và H₂S trong các ao nuôi thủy sản [12].

Vi khuẩn quang hợp tía là nhóm vi khuẩn quang dưỡng, sống kỵ khí hoặc kỵ khí tùy tiện trong môi trường có ánh sáng chiếu rọi. Chúng bao gồm vi khuẩn quang hợp tía lưu huỳnh và vi khuẩn quang hợp tía không lưu huỳnh. Chúng là các vi sinh vật điển hình, rất phổ biến ở nước ngọt cũng như nước mặn, thường cư trú nhiều trên bề mặt bùn các ao đầm tù, có nhiều bùn cặn các xác động, thực vật.

Trong nuôi trồng thủy sản, vi khuẩn quang hợp tía có thể được sử dụng như một chế phẩm sinh học làm sạch chất thải trong môi trường nước nuôi trồng thủy sản khi cho xuống ao nuôi định kỳ [3]. Vi khuẩn có thể làm mất ion nitơ trong nước, làm giảm BOD, giảm khí độc H₂S và các vi sinh vật khác do khả năng

phân giải vật chất hữu cơ, từ đó có thể kiểm chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh khác trong ao nuôi, đặc biệt là vi khuẩn *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* [4, 7]. Vì thế, việc sử dụng vi khuẩn quang hợp tía và các chất có hoạt tính sinh học do chúng sinh ra để cải tạo môi trường ao nuôi và khống chế sinh học là một phương pháp hiệu quả và thân thiện về mặt sinh thái và môi trường.

Ở Việt Nam hiện nay, đối tượng này đã được tìm kiếm, phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu các đặc điểm sinh học cơ bản nhằm ứng dụng trong một số lĩnh vực: công nghệ môi trường [2], thu nhận hoạt chất sinh học và bước đầu ứng dụng trong nuôi cá rô phi thâm canh [3], cũng như làm thức ăn cho ấu trùng nhuyễn thể và các đối tượng thủy sản khác [14]. Kết quả bước đầu cho thấy vi khuẩn quang hợp tía không những làm giảm hàm lượng H₂S trong nước, trong bùn [3] mà còn ảnh hưởng tốt đến tốc độ sinh trưởng và phát triển của các đối tượng nuôi [14]. Ngoài ra, việc sử dụng vi khuẩn quang hợp tía còn làm giảm hàm lượng BOD trong ao nuôi [3, 14]. Mục đích nghiên cứu này nhằm phân lập và nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn quang hợp tía từ các ao nuôi tôm thẻ chân trắng tại tỉnh Thừa Thiên - Huế, cung cấp cơ sở khoa học cho việc ứng dụng vi khuẩn quang hợp trong xử lý ô nhiễm trong nuôi trồng thủy sản.

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Email: nguyennngocphuoc@hualf.edu.vn

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**2.1. Phương pháp thu mẫu bùn đáy**

Mẫu bùn đáy ao nuôi tôm được thu từ 10 ao nuôi tôm công nghiệp ở xã Phong Hải, Điền Lộc thuộc huyện Phong Điền; xã Rú Chá, huyện Phú Vang và xã Vinh Xuân thuộc huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên - Huế. Mỗi ao nuôi thu 100 g bùn đáy (độ dày bùn là 5 cm) và 100 mL nước ở đáy ao. Mẫu bùn và nước được giữ trong hộp nhựa, bảo quản lạnh, vận chuyển về Phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế và được xử lý ngay.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn quang hợp tía từ bùn đáy ao

Đầu tiên mẫu bùn đáy được làm giàu vi khuẩn quang hợp tía theo phương pháp Winogradsky's được mô tả bởi Hunter *et al.* (2009) [4]. Các mẫu bùn đáy ở các ao khác nhau được cho vào các chai thủy tinh 500 mL riêng biệt, sau đó bổ sung 5g CaSO₄ và 10g cellulose và cho mẫu nước vào trộn đều. Một lớp paraffin với độ dày 1 cm được bổ sung trên bề mặt để ngăn cản sự hoà tan các chất khí vào môi trường nuôi cấy. Nuôi cấy ở nhiệt độ 28-30°C với cường độ chiếu sáng 2400 Lux. Cường độ chiếu sáng được xác định bằng Illuminometer I-346 Illuminometer (Sekonic Co., Philippines). Sau 2 tuần nuôi cấy, lấy 10 mL dung dịch trên cho vào 150 mL môi trường DSMZ-27 [1] và nuôi cấy cùng điều kiện trong 7 ngày.

2.3. Phương pháp phân lập và tạo dòng thuần

Lấy 100 µL dung dịch nuôi cấy ở môi trường DSMZ-27 trong 7 ngày ở trên cấy đều trên đĩa thạch chứa môi trường DSMZ-27 agar (bổ sung 2% agar vào môi trường DSMZ-27). Các đĩa thạch được nuôi cấy trong điều kiện không có oxy bằng cách sử dụng các lọ nén nuôi cấy kỵ khí cường độ chiếu sáng là 2400 Lux cho đến khi xuất hiện các khuẩn lạc. Các khuẩn lạc có hình dạng và màu sắc khác nhau được cấy chuyển trên môi trường DSMZ-27 agar và nuôi cấy với điều kiện như trên đến khi tạo được khuẩn lạc thuần.

2.4. Phương pháp nuôi sinh khối

Lấy 1 khuẩn lạc rời từ các đĩa thạch chứa khuẩn lạc thuần cho vào 40 mL môi trường DSMZ-27 có bổ sung 10 mg/L Na₂S sau đó cho 1 lớp paraffin dày 1 cm lên bề mặt và nuôi cấy trong tủ lắc (SI600C, Stuart, UK) ở tốc độ 120 rpm, 28-30°C và 2400 Lux. Sau 7 ngày nuôi cấy, huyền phù vi khuẩn được đo dưới bước sóng 660 nm (OD₆₆₀) bằng máy đo quang

phổ (4111 RS, Zuzi, Japan). Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

2.5. Phương pháp xác định đặc điểm sinh hoá

Đặc điểm sinh hoá của các chủng vi khuẩn được xác định bằng API 20E (BioMérieux, Mỹ). Các tấm API 20E strips được bổ sung dung dịch vi khuẩn với nồng độ 10⁵ cfu/mL trong môi trường CHB/E medium (BioMérieux, Mỹ) theo hướng dẫn của công ty và đọc kết quả sau 2 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C.

2.6. Phương pháp định danh vi khuẩn bằng giải trình tự gen 16S rRNA

DNA của các chủng vi khuẩn phân lập được trích ly bằng DNA preparation Kit (SolGent, Korea), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') để khuếch đại gen 16S rRNA ở máy Thermal Cycler Dice® Gradient (Takara, Shiga, Nhật Bản) [6]. Hỗn hợp phản ứng PCR được tiến hành gồm DNA của chủng vi khuẩn đã được trích ly, 0,5 mM mỗi đoạn mồi, 1U Taq polymerase (Takara, Shiga, Nhật Bản), 100 mM dNTPs và 2,5 mM MgCl₂. Các mẫu được xử lý nhiệt ở 95°C trong 15 phút và sau đó được khuếch đại với 30 chu kỳ nhiệt gồm 95°C trong 20 giây, 50°C trong 40 giây và 72°C trong 90 giây. Sản phẩm sau khi khuếch đại được chạy điện di trên 1% agarose gel và DNA được quan sát dưới đèn UV sau khi nhuộm ethidium bromide. Sản phẩm sau khi khuếch đại được tinh sạch bằng DNA clean up system (Bioneer, Daejeon, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó được giải trình tự nucleotide tại phòng thí nghiệm Head Diagnostics institute Manufacturing Center, Biochemical Research Institute (Hàn Quốc).

So sánh sự giống nhau của gen 16S rRNA giữa các chủng vi khuẩn được thực hiện bằng phần mềm Basic Local Alignment Search Tool program (BLAST) trên trang National Center for Biotechnology Information (NCBI). Trình tự các acid nucleic của gen 16S rRNA được hiệu chỉnh bằng phần mềm Clustal W2 editor trên trình duyệt www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/.

Phân tích quan hệ gần gũi giữa các chủng phân lập được thực hiện bởi công cụ PHYLIP theo Saitou và Nei (1987) [10]. Cây phả hệ được xác định bằng phần mềm MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016; Tamura *et al.*, 2013) xử lý bootstrap với 1000 lần lặp [8,11].

2.7. Đánh giá ảnh hưởng của pH và nồng độ NaCl lên sự phát triển của vi khuẩn quang hợp tía

Các chủng vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ pH lần lượt là: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và nồng độ NaCl lần lượt là: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 và 35‰, nhiệt độ 28 - 30°C, chiếu sáng liên tục. Sinh trưởng của vi khuẩn được xác định sau 7 ngày nuôi cấy bằng phương pháp đo mật độ quang học ở bước sóng 660 nm (OD_{660}) và đếm khuẩn lạc.

2.8. Xác định khả năng sử dụng cao nấm men

Các chủng vi khuẩn quang hợp tía được nuôi cấy trong môi trường DSMZ 27 lỏng, với nồng độ cao nấm men khác nhau: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 (g/L) ở pH 6,8 - 7,0, nhiệt độ 28 - 30°C, kỵ khí, có ánh sáng. Nuôi cấy lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn tía sau 7 ngày bằng cách sử dụng phương pháp đo mật độ quang học ở bước sóng 660 nm (OD_{660}) và đếm khuẩn lạc.

2.9. Xác định khả năng khử sunfide

Chủng vi khuẩn quang hợp được nuôi cấy trên môi trường DSMZ - 27 lỏng chứa Na_2S ở các nồng độ 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 và 2 mM ở điều kiện kỵ khí, có ánh sáng. Khả năng khử sulfide của chúng sau một thời gian nuôi cấy nhất định được xác định thông qua hàm lượng sulfide còn lại bằng phương pháp chuẩn độ.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu mẫu và phân lập vi khuẩn quang hợp tía

Từ 10 mẫu bùn và nước ao thuộc 3 huyện của tỉnh Thừa Thiên - Huế đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn với màu sắc khuẩn lạc và tốc độ tăng trưởng của các chủng này trong môi trường DSMZ-27 lỏng bổ sung 10 mg/L Na_2S được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn quang hợp tía

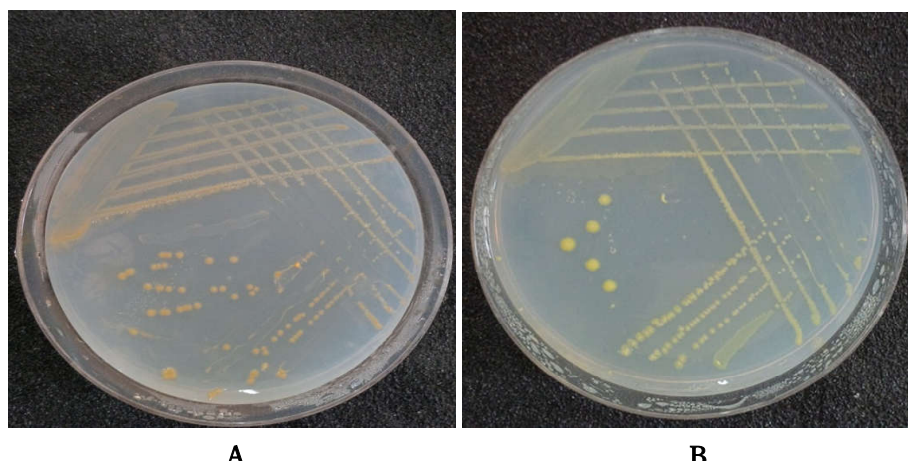
Địa điểm thu mẫu	Điện Lọc	Điện Lọc	Rú Chá	Rú Chá	Phú Lộc	Phú Lộc	Phong Hải	Phong Hải
Ký hiệu mẫu	DL11	DL21	RC11	RC21	PL11	PL21	PH11	PH21
Khuẩn lạc	Hình dạng	Tròn đều	Tròn	Tròn	Tròn	Không đều	Không đều	Tròn
	Bề mặt	Lồi	Lồi	Lồi	Hơi lồi	Hơi lồi	Lồi	Lồi
	Sắc tố	Vàng	Trắng	Đỏ cam	Trắng	Trắng	Trắng	Vàng
	Màu sắc	Đục	Hơi đục	Đục	Đục	Đục	Đục	Đục
Nhuộm Gram	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Hình thái tế bào	Que	Cầu	Ovan	Que	Que	Cầu	Cầu	Que
OD_{660}	Ban đầu	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Sau 7 ngày	1,10	0,10	0,24	0,34	0,45	0,22	1,21

Từ kết quả bảng 1 nhận thấy:

Khuẩn lạc của 8 chủng vi khuẩn phân lập được có màu trắng, đỏ cam và vàng. Các chủng (3) tạo khuẩn lạc màu vàng hoặc đỏ cam có tế bào dạng hình que, các chủng có khuẩn lạc màu trắng có tế bào dạng hình cầu hoặc hình ovan.

Khả năng tích lũy sinh khối trong môi trường nuôi cấy tăng sinh của các chủng nuôi cấy sau 7 ngày khác nhau ở các địa điểm thu mẫu: Chủng vi khuẩn DL21 được phân lập từ Điện Lọc có mật độ quang học thấp nhất ($OD_{660} = 0,10$). Chủng vi khuẩn này phát triển rất yếu trong môi trường nuôi cấy DSMZ-27 lỏng. Các chủng vi khuẩn được phân lập tại Rú

Chá (RC11 và RC21), Phú Lộc (PL11 và PL21) phát triển mạnh hơn trong môi trường tăng sinh, tuy nhiên mật độ quang học của các chủng này không cao ($OD_{660} < 0,5$). Các chủng vi khuẩn được ký hiệu DL11, PH21 có mức độ tích lũy sinh khối cao nhất, OD_{660} tương ứng 1,10 và 1,21. Khuẩn lạc chủng DL11 có màu đỏ cam trên môi trường nuôi cấy trong khi đó khuẩn lạc chủng PH21 có màu vàng (Hình 1). Quan sát hình dạng tế bào của 2 chủng DL11 và PH21 cho thấy chúng có dạng hình que và bắt màu vi khuẩn Gram (-). Đây là hình dạng tế bào thường có ở các loài vi khuẩn quang hợp tía. Hai chủng DL11 và PH21 được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.



A

B

Hình 1. Khuẩn lạc vi khuẩn quang hợp sau 7 ngày nuôi cấy

A: Khuẩn lạc chủng DL11, B: Khuẩn lạc chủng PH21

3.2. Đặc điểm sinh hóa của hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21

Cả hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21 đều có đặc điểm sinh hoá khá tương đồng, đều là vi khuẩn Gram (-), oxydase âm tính, giữa hai chủng chỉ khác nhau ở 2 đặc điểm là khả năng lên men

trisodium citrate và D-glucose. Chủng vi khuẩn DL11 không có khả năng lên men đường D-glucose và trisodium citrate. Trong khi đó chủng PH21 đều có khả năng lên men tốt hai loại đường này (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả phản ứng sinh hóa của chủng DL11 và PH21

Phản ứng	DL11	PH21	Phản ứng	DL11	PH21
Sulfide	+	+	Gelatin	-	-
2-nitrophenyl	-	-	D-glucose	-	+
β Dgalactopyranoside					
L-arginine	-	-	D-mannitol	-	-
L-lysine	-	-	Inositol	-	-
L-ornithine	-	-	D-sorbitol	-	-
Trisodium citrate	-	+	L-rhamnose	-	-
Sodium thiosulfate	-	-	D-sucrose	+	+
Urea	-	-	D-melibiose	-	-
L-tryptophane	-	-	Amygdalin	-	-

Chú thích: (+) Phản ứng dương tính; (-) Phản ứng âm tính

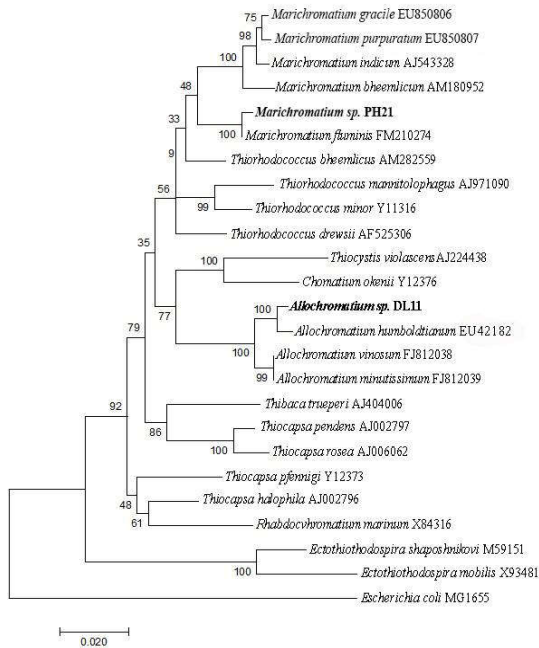
3.3. Kết quả định danh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn quang hợp được ký hiệu DL11 và PH21 được sử dụng để phân tích gen mã hóa 16S - rRNA, kết quả mã hoá trình tự acid nucleic và phân tích trên phần mềm BLAST được trình bày ở hình 2.

Chủng DL11 có trình tự gen mã hóa 16S - rRNA tương đồng rất cao với các loài *Allochrochromatium humboldtianum* (EU442182), *Allochrochromatium vinosum* (FJ812038) và *Allochrochromatium minutissimum* (FJ812039) với độ tương đồng đạt

100%, 98% và 98%. Chủng PH21 có trình tự gen mã hóa 16S - rRNA tương đồng rất cao với loài *Marichromatium fluminis* (FM210274) với sự tương đồng đạt 100%. Ngoài ra chủng PH21 còn có sự tương đồng với các loài *Marichromatium indicum* (AJ543328), *Marichromatium bheemlicum* (AM180952) với mức độ tương đồng 95% và 93%. Từ kết quả trên có thể kết luận chủng DL11 là vi khuẩn *Allochrochromatium* sp. và chủng PH21 là vi khuẩn *Marichromatium* sp.. Hai chủng này đều là vi khuẩn quang hợp tia lưu huỳnh thuộc họ Chromatiaceae. Chúng có khả năng chuyển hóa năng lượng mặt trời

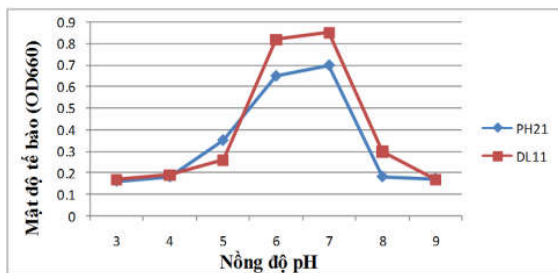
thành năng lượng hóa học bởi quá trình quang hợp kỵ khí. Vi khuẩn quang hợp tía thường có màu hồng đến màu đỏ tía, sắc tố quang hợp chính là bacteriochlorophyll a hoặc b. Cơ quan quang hợp là màng quang hợp được gắn với màng tế bào [8].



Hình 2. Cây phả hệ của chủng DL11 và PH21

3.4. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21

Nhằm đánh giá khả năng phát triển của các chủng vi khuẩn quang hợp được chọn lọc ở các điều kiện pH khác nhau, 2 chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường DSMZ 27 lỏng với 7 mức pH từ 3 đến 9 trong điều kiện kỵ khí và được chiếu sáng liên tục. Ảnh hưởng pH đến khả năng sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn này được thể hiện ở hình 3.



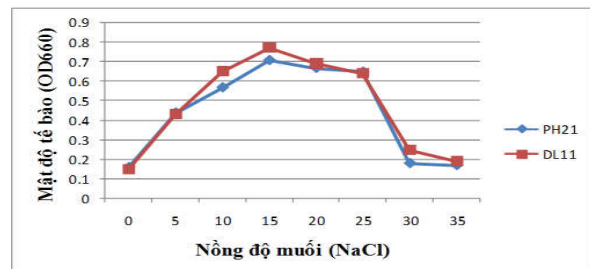
Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21

Mật độ vi khuẩn sau 7 ngày nuôi cấy phát triển mạnh ở pH từ 5 - 7, đạt cao nhất ở các mức pH từ 6 - 7. Hai chủng PH21 và DL11 hầu như không phát

triển ở pH = 9 và pH ≤ 4. Như vậy có thể nhận thấy ngưỡng pH thích hợp cho các chủng vi khuẩn quang hợp tía phát triển là 6 - 7. Theo Hunter *et al.* (2009), quang hợp của vi khuẩn có thể xảy ra trong môi trường có pH 3 - 11, sinh trưởng và phát triển tối ưu ở pH khoảng 6 - 7 [4]. Như vậy các chủng vi khuẩn quang hợp tía ở Thừa Thiên - Huế có ngưỡng pH giống với các chủng vi khuẩn khác trên thế giới.

3.5. Ảnh hưởng của NaCl đến sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21

Khảo sát ảnh hưởng của NaCl đến sinh trưởng của vi khuẩn quang hợp tía nhằm đánh giá khả năng chịu mặn của các chủng được chọn lọc. Mật độ tế bào của 02 chủng vi khuẩn DL11 và PH21 nuôi cấy trong môi trường có độ mặn thay đổi: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 và 35‰ được thể hiện ở hình 4.

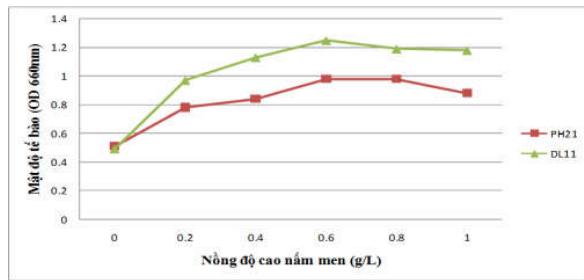


Hình 4. Khả năng sinh trưởng của các hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21 ở các nồng độ muối khác nhau

Chủng PH21 sinh trưởng tốt ở độ mặn 5‰ đến 25‰. Ở mức độ mặn từ > 25 - 30‰ vi khuẩn sinh trưởng chậm, ở mức độ mặn 0‰ và 35‰ vi khuẩn hầu như không phát triển. Chủng vi khuẩn DL11 phát triển tốt ở độ mặn 10 - 25‰. Ở mức độ mặn 30 - 35‰ vi khuẩn phát triển chậm. Cả 2 chủng vi khuẩn này phân lập tại các ao nuôi tôm nên khả năng chịu độ mặn của chúng khá cao. Theo Mack *et al.* (1993) vi khuẩn quang hợp tía có thể sống được trong môi trường nước biển có độ mặn cao, có loài có thể sống ở độ mặn lớn hơn 80‰ nhưng các chủng vi khuẩn quang hợp tía ở Thừa Thiên - Huế thích nghi với ngưỡng độ mặn thấp hơn [9].

3.6. Ảnh hưởng của cao nấm men đến sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21

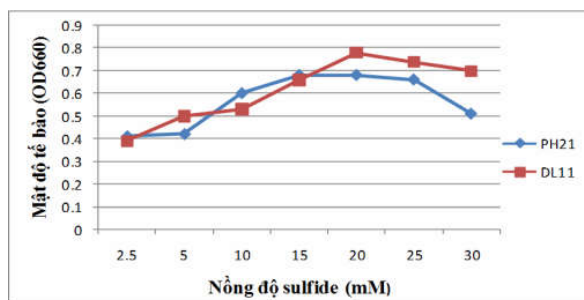
Sự phát triển của các chủng PH21 và DL11 phụ thuộc vào nồng độ cao nấm men bổ sung vào môi trường nuôi cấy (Hình 5). Tốc độ tăng trưởng của 2 chủng vi khuẩn tốt nhất khi bổ sung cao nấm men với hàm lượng 0,6 g/L và có xu hướng giảm khi nồng độ nấm men bổ sung là 0,8-1 g/L.



Hình 5. Ảnh hưởng của cao nấm men đến sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21

3.7. Khả năng khử sulfide của hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21

Đánh giá khả năng sử dụng Sulfide của các chủng vi khuẩn tuyển chọn, sau 7 ngày nuôi cấy ở điều kiện kỵ khí, có chiếu sáng và nhiệt độ 28 - 30°C được thể hiện ở hình 6. Tốc độ tăng trưởng của cả 2 chủng đạt cao nhất ở môi trường nuôi cấy có bổ sung 20 ml/L Na_2S . Khi nồng độ sulfide trong môi trường cao hơn 20 mg/L, tốc độ sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều giảm. Đặc biệt, ở hai chủng PH21 và DL11 mật độ vi khuẩn giảm xuống thấp nhất khi hàm lượng sulfide tăng lên 30 mg/L. Nồng độ sulfide thích hợp cho các chủng vi khuẩn tuyển chọn phát triển mạnh nhất là 10 - 20 mg/L. Nhiều loài vi khuẩn tía có thể sinh trưởng quang dưỡng với sulfide như là chất cho điện tử với nồng độ nhỏ hơn 2 mM [13]. Nếu nồng độ sulfide quá cao hay quá thấp cũng ức chế một phần đến sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn được chọn [5]. Khả năng sử dụng H_2S là đặc điểm quan trọng khi sử dụng vi khuẩn quang hợp trong xử lý chất thải trong ao nuôi thủy sản [3].



Hình 6. Tốc độ sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn DL11 và PH21 ở các nồng độ sulfide

4. KẾT LUẬN

Từ 10 mẫu nước, mẫu bùn được thu tại các huyện: Phú Vang, Phú Lộc và Phong Điền đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn quang hợp. Trong 8

chủng phân lập được thì 02 chủng PH21, DL11 có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường nuôi cấy. Kết quả phân loại và định danh chủng DL11 là *Allochrochromatium* sp. và chủng PH21 là *Marichrochromatium* sp.. Cả 2 chủng PH21 và DL11 đều sinh trưởng và phát triển tốt ở nồng độ muối 10‰-20‰ và không sinh trưởng ở nồng độ dưới 5‰ và trên 35‰, hoạt động tốt nhất ở nồng độ sulfide từ 10 - 20 mg/L. Việc bổ sung cao nấm men vào môi trường nuôi cấy đã kích thích khả năng sinh trưởng của 2 chủng PH21 và DL11.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Biebl, H., Pfennig, N. (1978). Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate reducing bacteria. Archives of Microbiology 117, 9-16.
2. Đỗ Thị Liên, Đỗ Thị Tố Uyên, Trần Văn Nhị (2008). Một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn quang hợp tía thuộc chi Rhodobacter có khả năng loại bỏ Sulfide phân lập từ vùng ven biển Quảng Ninh. Công nghệ sinh học 4: 497-504.
3. Đỗ Thị Liên, Nguyễn Thị Diệu Phương, Nguyễn Thị Biên Thùy, Đỗ Thị Tố Uyên, Đinh Duy Kháng (2014). Ảnh hưởng của chế phẩm vi khuẩn quang hợp tía đến chất lượng môi trường ao nuôi cá rô phi thâm canh. Tạp chí Khoa học và Phát triển 12(03): 379 - 383.
4. Ehrenreich, A., and Widdel. F. (1994). Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. Applied Environmental Microbiology 60: 4517-4526.
5. Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer. M. C. and Beatty, J. T. (2009). The Purple Phototrophic Bacteria, Chapter 1: An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats: 2 - 15.
6. Imhoff, J. F., Truper, H. G. and Pfennig, N. (1984). Rearrangement of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfide bacteria. In: Advances in Photosynthesis and Respiration. Vol. 28. Springer, Dordrecht, 1014 pp.
7. Kumar, P. A., Srinivas, T. N. R., Sasikala, C., Ramana, C. V. (2008). *Allochrochromatium renukae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58 (2): 404-407.
8. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, msw054.

9. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees., Molecular Biology and Evolution, 4 (4): 406-425.

10. Mack, E. E., Mandelco, L., Woese, C. R., Madigan, M. T. (1993). *Rhodospirillum sodomense* sp. nov., a Dead Sea Rhodospirillum species. Arch Microbiol 160: 363-371.

11. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, Molecular Biology and Evolution, 30 (12): 2725-2729.

12. Truper, H. G., and Fischer, U. (1982). Anaerobic oxidation of sulphur compounds as electron donors for bacterial photosynthesis. Philosophical transactions of The Royal Society of London B 298: 531-540.

13. Zeyer, J., Eicher, P., Wakeham, S.G. and Schwarzenbach, R. P. (1987). Oxidation of Sulfide to Dimethyl Sulfoxide by Phototrophic Purple Bacteria. Applied Environmental Microbiology 53 (9): 2026-2032.

14. Đỗ Thị Tố Uyên, Đỗ Thị Liên, Lê Thị Nhi Công, Hoàng Thị Yến, Nguyễn Thị Diệu Phương (2015). Ứng dụng vi khuẩn quang hợp tím trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam. Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long 8: 27-36.

ISOLATION THE PHOTOTROPHIC PURPLE BACTERIA FROM MUD SHRIMP PONDS IN THUA THIEN - HUE PROVINCE

Nguyen Ngoc Phuoc, Nguyen Nam Quang, Nguyen Duc Quynh Anh

Summary

The aim of this study is to investigate the feasibility of using phototrophic purple bacteria to remove sulfide from the mud of the shrimp ponds. The 8 isolates of phototrophic purple bacteria from the waste of 10 the intensive culture farms of white leg shrimp in Thua Thien - Hue. Two of eight isolates (DL11 and PH21) which showed the high biomass when cultured in DSMZ27 broth in the anaerobic culture condition were selected for further study on biological characteristics and sulfide removal. The two isolates were Gram-negative, rod shape. The identification show that the strains DL11 were *Allochrochromatium* sp., whereas strain PH21 were identified as *Marichrochromatium* sp.. These strains grew better in the condition of 10% - 20%, pH: 6-7. Better growth rate of both strains were observed when high amount of yeast extract added. Moreover, results showed that in the anaerobic condition, these both 2 strains can be effectively used for sulfide removal (94.4% sulfide removal efficiencies were obtained when culture in the medium with 10-20 mg/L of sulfide added).

Keywords: Shrimp pond, DSMZ27 medium, phototrophic purple bacteria, *Allochrochromatium*, *Marichrochromatium*.

Người phản biện: PGS.TS. Lê Như Kiều

Ngày nhận bài: 22/3/2021

Ngày thông qua phản biện: 23/4/2021

Ngày duyệt đăng: 4/5/2021