

**Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn tía không lưu huỳnh nhằm xử lý sulfide
trong ao nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam**

**Hoàng Thị Ngọc Anh*, Trần Thị Bảo Yên, Nguyễn Võ Trà My,
Nguyễn Thị Hồng Tâm, Nguyễn Thúy Hằng**

Công ty TNHH Tập đoàn Sinh học AQ, phường Đông Ngạc, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 16/9/2025; ngày chuyển phản biện 23/9/2025;

ngày nhận phản biện 30/9/2025; ngày chấp nhận đăng 13/10/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu với mục tiêu phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn tía không lưu huỳnh từ 10 mẫu nước và 15 mẫu bùn của các ao nuôi thủy sản khác nhau tại tỉnh Ninh Bình, Việt Nam nhằm xác định những chủng có tiềm năng xử lý sulfide trong nước, từ đó góp phần cải thiện chất lượng nước, nâng cao năng suất và giảm rủi ro dịch bệnh trong các ao nuôi thủy sản. Kết quả phân lập được 17 chủng vi khuẩn có khả năng xử lý sulfide, trong đó chủng ND2 và NH6 có khả năng xử lý sulfide cao nhất (>96%) trong điều kiện sulfide (10-20 mg/l). Chủng ND2 và NH6 sinh trưởng tốt nhất ở 2% NaCl, sau đó giảm khi tăng 3-5% NaCl. Giá trị OD_{660nm} lần lượt đạt 1,03 và 1,15 ở 2% NaCl. Chủng ND2 và NH6 có khả năng xử lý sulfide cao trong môi trường 2-3% NaCl, hiệu suất xử lý lần lượt đạt 97,48% và 96,40% tại 2% NaCl. Hiệu suất xử lý sulfide giảm ở 4-5% NaCl, hiệu suất xử lý sulfide của chủng ND2 và NH6 lần lượt đạt 86,79% và 84,84% ở 5% NaCl. Chủng ND2 sinh trưởng và xử lý sulfide tốt hơn chủng NH6 ở nồng độ muối cao 2-5%, được lựa chọn định danh sinh học phân tử xác định thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum*. Như vậy, *Rhodovulum sulfidophilum* ND2 có tiềm năng cao ứng dụng xử lý hiệu quả sulfide trong nước nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: phân lập, *Rhodovulum sulfidophilum*, sulfide, tuyển chọn, vi khuẩn quang dưỡng tía không lưu huỳnh.

Chỉ số phân loại: 4.5, 4.6

**Isolation and characterisation of purple non-sulfur bacteria for sulfide removal in
aquaculture ponds of Vietnam**

**Thi Ngoc Anh Hoang*, Thi Bao Yen Tran, Vo Tra My Nguyen, Thi Hong Tam
Nguyen, Thuy Hang Nguyen**

AQ Biological Group Company Limited, Dong Ngac Ward, Hanoi, Vietnam

Received 16 September 2025; revised 30 September 2025; accepted 13 October 2025

*Tác giả liên hệ: Email: hoangngocanh.edu@gmail.com

Abstract:

This study aimed to isolate and select purple non-sulfur bacteria (PNSB) strains from 10 water and 15 sediment samples collected from various aquaculture ponds in Ninh Binh province, Vietnam, with the potential to remove sulfide from water, thereby contributing to improving water quality, enhancing productivity, and reducing the risk of disease outbreaks in aquaculture systems. A total of 17 PNSB strains were successfully isolated, among which strains ND2 and NH6 exhibited the highest sulfide removal efficiency (>96%) under sulfide concentrations of 10-20 mg/l. Both strains showed optimal growth at 2% NaCl, with OD_{660nm} values of 1.03 and 1.15, respectively, and their growth decreased at higher salinities (3-5% NaCl). Sulfide removal efficiency remained high in media containing 2-3% NaCl, achieving 97.48% for ND2 and 96.40% for NH6 at 2% NaCl. However, efficiency decreased at 4-5% NaCl, with ND2 and NH6 showing 86.79% and 84.84% removal at 5% NaCl, respectively. Notably, strain ND2 exhibited superior growth and sulfide degradation capability under high salinity (2-5% NaCl) and was identified by molecular analysis as *Rhodovulum sulfidophilum*. These findings suggest that *Rhodovulum sulfidophilum* ND2 is a promising candidate for application in sulfide remediation and water quality improvement in aquaculture systems.

Keywords: isolation, purple non-sulfur phototrophic bacteria, *Rhodovulum sulfidophilum*, screening, sulfide.

Classification numbers: 4.5, 4.6

1. Đặt vấn đề

Ngành nuôi trồng thủy sản đã tăng trưởng nhanh chóng nhằm đáp ứng nhu cầu thực phẩm ngày càng lớn của dân số thế giới, tuy nhiên nguồn tài nguyên hải sản trên toàn cầu đang dần bị hạn chế. Sự thiếu hụt diện tích đất dành cho nuôi tôm đã dẫn đến việc áp dụng mô hình nuôi thâm canh để đáp ứng nhu cầu thị trường [1]. Trong môi trường nuôi thâm canh, lượng lớn thức ăn dư thừa và chất thải từ tôm sẽ tích tụ ở đáy ao và được chuyển đổi kỵ khí tạo thành khí NH₃, H₂S. Cả hai hợp chất này đều độc đối với tôm, chúng làm giảm tốc độ sinh trưởng, tăng tỷ lệ chết và làm suy giảm chất lượng nước [2].

Khí H₂S hình thành trong điều kiện yếm khí của hệ thống nuôi thủy sản có mùi đặc trưng của trứng thối. Sự tích tụ khí này ở nồng độ cao không chỉ ảnh hưởng đến tỷ lệ sống mà còn tác động xấu đến hoạt động sinh lý và miễn dịch của sinh vật thủy sinh. Theo D. Thulasi và cs (2020) [3], khoảng 10% tổn thất mùa vụ trong nuôi tôm có liên quan đến quá trình tạo sulfide và có thể đã có tới 4 triệu tấn tôm chết do hiện tượng thoát khí sulfide. Mặc dù độc tính của sulfide cao gấp 100 lần so với các hợp chất chứa nitơ,

nhưng trong thực tế sulfide hầu như không được đo đạc tại các đầm nuôi thủy sản [3]. Các phương pháp hiện nay để kiểm soát sự tích tụ chất thải và những tác động tiêu cực của sulfide trong ao nuôi chủ yếu là xử lý cơ học để loại bỏ hoặc oxy hóa bùn đáy. Đây là phương pháp đòi hỏi nhiều nhân công và thường chỉ có thể thực hiện trong giai đoạn khô hạn giữa các vụ nuôi tôm [4]. Do đó trong những năm gần đây, các nghiên cứu đã tập trung vào việc sử dụng vi khuẩn quang dưỡng tía không lưu huỳnh (PNSB) để cải thiện chất lượng nước và giảm khí độc nhằm giảm chất ô nhiễm và kiểm soát mùi một cách bền vững [2].

Vi khuẩn PNSB thường được tìm thấy trong các nguồn nước tự nhiên, bao gồm cả ao nuôi tôm do chúng có nhiều kiểu sinh trưởng đa dạng như: quang tự dưỡng hoặc quang dị dưỡng trong điều kiện yếm khí - ánh sáng hoặc vi hiếu khí - ánh sáng và dị dưỡng trong điều kiện hiếu khí - tối. Điều này có nghĩa, chúng có thể tiêu thụ chất hữu cơ cả trong điều kiện sáng lẫn tối và một số loài còn có khả năng loại bỏ H_2S [5].

Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập, tuyển chọn các chủng PNSB từ nước và bùn của các ao nuôi trồng thủy sản tại tỉnh Ninh Bình, có tiềm năng trong việc giảm H_2S hiệu quả trong môi trường tổng hợp, từ đó cải thiện chất lượng nước, nâng cao năng suất và giảm rủi ro dịch bệnh trong các ao nuôi tôm. PNSB trong ao nuôi thủy sản vừa có tác dụng cải thiện chất lượng môi trường nước, vừa tăng cường sức khỏe và hiệu suất nuôi của tôm, cá. Đây là cơ sở để nhiều chế phẩm vi sinh thương mại hiện nay bổ sung PNSB như một probiotic sinh học trong nuôi trồng thủy sản.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Thu thập mẫu

10 mẫu nước và 15 mẫu bùn được thu thập từ các ao nuôi thâm canh, quảng canh khác nhau (tôm thẻ chân trắng, cua biển, vẹm xanh và cá rô phi) tại tỉnh Ninh Bình. Mẫu phân tích được thu thập theo TCVN 8880:2011 “Chất lượng nước - lấy mẫu để phân tích vi sinh”. Đối với mẫu nước, sử dụng chai nhựa sạch dung tích 1000 ml; mỗi mẫu nước được lấy ở 3-4 vị trí khác nhau trong một ao, độ sâu cách mặt nước khoảng 1 đến 1,5 m và cách bờ khoảng 1 m mỗi ao. Trong khi đó đối với mẫu bùn, 100 g bùn đáy ao với độ dày 5 cm đựng trong túi zip sạch. Tất cả các mẫu sau đó được đậy kín, kí hiệu mẫu, ghi rõ địa điểm lấy mẫu, bảo quản lạnh và được vận chuyển về phòng thí nghiệm, giữ ở 4°C. Các mẫu được phân lập trong vòng không quá 24 giờ.

2.1.2. Môi trường tăng sinh và phân lập

Môi trường tăng sinh và phân lập chủng PNSB là môi trường DSMZ-27 cải tiến (g/l): succinate-Na 1,0; cao nấm men 0,3; acetate-Na 1,0; NH_4Cl 0,4; KH_2PO_4 0,5; K_2HPO_4 1,0; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,05; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,4; NaCl 20; H_2O 1 l; vi lượng SL6(*) 1

ml; dung dịch vitamin B12 0,4 ml; pH $6,8 \pm 0,2$. Môi trường thạch DSMZ-27: Môi trường DSMZ-27 bổ sung 20g/l agar. (*) Thành phần dung dịch vi lượng SL6 (g/l): $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25; $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,07; ZnCl_2 0,1; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{Na}_2\text{SiO}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,8; H_3BO_3 0,5; $\text{Na}_2\text{MoO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,03; H_2O 1 l.

Môi trường làm thuần chủng vi sinh vật: Môi trường King's B agar (KB) (g/l): glycerol 10; K_2HPO_4 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5; peptone 20; agar 20; H_2O 1 l; pH $7,0 \pm 0,2$. Tất cả các môi trường được hấp tiệt trùng bằng nồi hấp Tomy ES 315 (Nhật Bản) ở 121°C trong 15 phút. Tất cả hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được sản xuất tại Trung Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tăng sinh và phân lập vi khuẩn

Tất cả mẫu thu thập về phòng thí nghiệm được nuôi tăng sinh theo phương pháp Winogradsky's cải tiến [6]. Mẫu nước (2 ml) hoặc bùn đáy (5 g) được cho vào lọ thủy tinh (150×15 mm: 50 ml) riêng biệt chứa lần lượt 20 ml hoặc 45 ml môi trường DSMZ-27, sau đó được phủ một lớp (2 ml) paraffin hấp tiệt trùng để tạo điều kiện kỵ khí, vặn kín nắp. Tất cả các mẫu được ủ trong tủ ấm 303-1AB (Trung Quốc) ở nhiệt độ $28-30^\circ\text{C}$, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt 60 W (khoảng 2000 lux). Sau 7-10 ngày, các lọ xuất hiện màu từ nâu, vàng đến đỏ tía được chọn để tiếp tục phân lập trên đĩa petri chứa môi trường thạch DSMZ-27 bằng phương pháp cấy trang. Để tạo điều kiện kỵ khí, một lớp mỏng thạch DSMZ-27 được đổ lên đĩa sau khi cấy trang. Các đĩa ủ ở nhiệt độ $28-30^\circ\text{C}$, chiếu sáng. Các khuẩn lạc riêng rẽ có màu nâu, vàng đến đỏ tía sau đó được làm thuần theo phương pháp cấy rìa trên môi trường KB agar và xác định các đặc điểm hình dạng, màu sắc, hình thái tế bào bằng phương pháp nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi L2800 (Trung Quốc) vật kính 100X [7]. Các chủng thuần được lưu giữ trong dung dịch glycerol 20% ở -80°C .

2.2.2. Thử nghiệm sinh hóa xác định vi khuẩn tía không lưu huỳnh

Môi trường Simmon's citrate agar, urea agar đã được chuẩn bị để xác định khả năng sử dụng citrate, khả năng sinh enzyme urease [8]. Thuốc thử $\text{C}_6\text{H}_4[\text{N}(\text{CH}_3)_2]_2$ 1%, H_2O_2 3% và thuốc thử Kovac's được sử dụng để thử nghiệm hoạt tính oxidase, catalase, idole [8]. Tất cả các môi trường nuôi cấy được đổ vào các đĩa petri vô trùng riêng biệt hoặc ống nghiệm sau đó được cấy vi khuẩn PNSB đã phân lập và ủ 48-72 giờ. Đặc điểm sinh hóa chủng được so sánh với các chủng cùng loại theo thang phân loại vi khuẩn [9].

2.2.3. Sàng lọc khả năng xử lý sulfide của chủng PNSB

Chủng PNSB được nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 bổ sung $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ở các nồng độ 0; 10; 15; 20 mg/l nuôi cấy ở điều kiện kỵ khí, có chiếu sáng. Khả năng xử lý sulfide của các chủng vi khuẩn được đánh giá bằng phương pháp methylene blue

(SMEWW S²- B&D: 2017) sau 7 ngày nuôi cấy. Thuốc thử: dung dịch A: hòa tan 2,7 g C₈H₁₂N₂ trong 50 ml H₂SO₄ định mức 100 ml, thuốc thử chuẩn B: dung dịch A 2,5%; dung dịch C: hòa tan 100 g FeCl₃.6H₂O trong 40 ml nước, dung dịch D: hòa tan 400 g (NH₄)₂HPO₄ trong 800 ml nước. Thực hiện: hút 7,5 ml mẫu vào ống nghiệm, sau đó lần lượt cho vào 0,5 ml thuốc thử B; 150 μ l dung dịch C. Chờ 3-5 phút và thêm 1,6 ml dung dịch D vào mỗi ống. Chờ 3-15 phút và so màu ở bước sóng 660 nm. Đường chuẩn sulfide được xác định dựa trên sự thay đổi nồng độ Na₂S.9H₂O từ 0 đến 2,5 mg/l và xác định sự tương quan giữa nồng độ sulfide (C) và giá trị OD_{660nm} (A) theo phương trình $A=0,3731C+0,0002$ và xác định hàm lượng sulfide trong mẫu phân tích. Mỗi thí nghiệm được tiến hành ba lần lặp lại lấy giá trị trung bình.

2.2.4. Đánh giá khả năng xử lý sulfide ở các nồng độ muối khác nhau

Chủng vi khuẩn PNSB có khả năng khử sulfide tốt ở thí nghiệm trên được lựa chọn và nuôi cấy trong 20 ml môi trường DSMZ-27 chứa S²⁻ có nồng độ 10, 15, 20 mg/l và bổ sung NaCl ở các nồng độ 2, 3, 4, 5%, điều kiện nuôi cấy kỵ khí, chiếu sáng. Khả năng khử sulfide của các chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp methylene blue (SMEWW S²- B&D: 2017), khả năng sinh trưởng được xác định bằng phương pháp đo quang (OD) ở bước sóng 660 nm sau 7 ngày nuôi cấy.

2.2.5. Định danh và xây dựng cây phân loại vi khuẩn

Phân loại vi khuẩn PNSB bằng sinh học phân tử dựa trên trình tự *16S rRNA*. DNA tổng số được tách bằng Kit RIBO-prep của Liên Bang Nga. Gen *16S rRNA* được tổng hợp với cặp mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 1492R: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3' [10]. Sản phẩm PCR sau tinh sạch (bằng bộ kit Bioneer của Mỹ) được gửi đến trung tâm Macrogen (Hàn Quốc) để xác định trình tự. Phân tích phả hệ và xác định mối quan hệ di truyền với các chủng vi khuẩn khác bằng phần mềm MEGA 11.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

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 phần mềm SPSS 20. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được phân tích bằng ANOVA với mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả thu thập mẫu và phân lập vi khuẩn PNSB

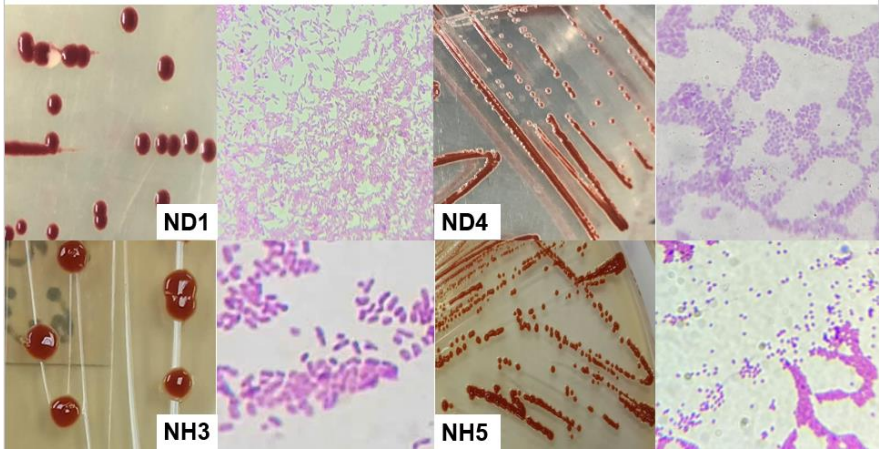
Từ 10 mẫu nước và 15 mẫu bùn phân lập được 17 chủng vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc khác nhau. Kết quả phân lập được trình bày cụ thể tại bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn phân lập.

Ký hiệu mẫu	Đặc điểm hình thái			
	Gram	Tế bào	Khuẩn lạc	Màu sắc
ND1	-	Que	Tròn, lồi	Đỏ tía
ND2	-	Que	Tròn, lồi	Đỏ tía
ND4	-	Cầu	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
ND5	-	Cầu	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
ND6	-	Que	Tròn, lồi	Đỏ tía
ND12	-	Que	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
ND13	-	Que	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH1	-	Cầu	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH2	-	Cầu	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH3	-	Que	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH4.1	-	Que	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH4.2	-	Que	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH5	-	Cầu	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH6	-	Que	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH8	-	Que	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH9.1	-	Cầu	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu
NH10	-	Que	Tròn, lồi, nhầy	Đỏ nâu

(-): gram âm.

Cụ thể, 17/17 chủng vi khuẩn là gram âm; 11/17 chủng có tế bào hình que chiếm 64,7%; 6/17 chủng có tế bào cầu chiếm 35,3%. Về hình thái khuẩn lạc, hầu hết các chủng có khuẩn lạc tròn, lồi, bóng nhầy ngoại trừ chủng ND1, ND2 và ND6 (hình 1). Về màu sắc khuẩn lạc, 3/17 chủng có màu đỏ tía chiếm 17,6%; 14/17 chủng có màu đỏ nâu chiếm 82,4%. Kết quả phân lập cho thấy, chủng phân lập có đặc điểm tương đồng với nhóm PNSB, kết quả này cũng được thể hiện ở nghiên cứu của T.V. Quyen và cs (2022) [11] và J.F. Imhoff (1989) [12].



Hình 1. Hình ảnh một số chủng vi khuẩn phân lập.

3.2. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn sau khi làm thuần khiết được thử nghiệm để xác định một số đặc điểm sinh hóa. Kết quả cụ thể được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm sinh hóa chủng vi khuẩn PNSB.

Ký hiệu chủng	Catalase	Oxidase	Citrate	Urease	Indole
ND1	+	+	-	+	-
ND2	+	+	-	+	-
ND4	+	+	-	-	-
ND5	+	+	-	-	-
ND6	+	+	-	+	-
ND12	+	+	-	-	-
ND13	+	+	-	-	-
NH1	+	+	-	-	-
NH2	+	+	-	-	-
NH3	+	+	-	+	-
NH4.1	+	+	-	+	-
NH4.2	+	+	-	+	-
NH5	+	+	-	-	-
NH6	+	+	-	+	-
NH8	+	+	-	-	-
NH9.1	+	+	-	-	-
NH10	+	+	-	-	-

(+): phản ứng dương tính; (-): phản ứng âm tính.

Kết quả bảng 2 cho thấy, hầu hết các chủng vi khuẩn đều phản ứng dương tính với oxidase và catalase, phản ứng âm tính với citrate và indole; 7/17 chủng dương tính với urease. Đặc điểm sinh hóa chủng vi khuẩn cho thấy, chủng vi khuẩn phân lập được có kết quả tương đồng với nghiên cứu trước đó của H.T. Yen và cs (2019) [13] và A. Srinivas và cs (2014) [14]. Kết quả này bước đầu xác nhận các chủng vi khuẩn phân lập được có thể thuộc chi *Rhodovulum*.

3.3. Khả năng xử lý sulfide của các chủng vi khuẩn PNSB

Bảng 3. Kết quả xử lý sulfide và khả năng sinh trưởng của các chủng PNSB.

Ký hiệu chủng	Nồng độ sulfide (mg/l)			
	0	10	15	20
ND1	1,22±0,74	1,25±1,20	1,21±0,38	1,00±0,36
ND2	1,05±0,38	1,12±0,56	1,11±0,02	1,04±0,45
ND4	1,29±0,74	1,17±1,14	1,04±0,08	1,08±0,08
ND5	0,93±0,29	1,12±0,69	1,11±0,18	1,03±0,06
ND6	0,77±0,42	0,95±0,46	0,94±0,17	0,78±0,12
ND12	0,84±0,43	1,02±1,19	0,99±0,21	0,98±0,25
ND13	0,84±0,49	0,81±0,60	0,47±0,18	0,56±0,26
NH1	1,17±0,46	1,04±0,84	0,98±0,40	0,90±0,15
NH2	1,26±0,56	1,26±0,76	1,16±0,32	1,06±0,33
NH3	1,31±0,38	1,19±0,20	1,01±0,64	0,92±0,42
NH4.1	1,06±0,45	0,91±0,29	0,89±0,16	0,80±0,21
NH4.2	0,86±0,42	0,92±0,40	0,47±0,31	0,45±0,11
NH5	0,80±0,63	1,11±1,21	0,55±0,05	0,53±0,19
NH6	1,25±0,33	1,12±0,48	0,76±0,25	0,76±0,04
NH8	0,77±0,84	1,04±0,45	0,91±0,03	0,50±0,06
NH9.1	1,26±0,51	1,27±0,41	1,14±0,46	1,05±0,41
NH10	1,18±0,17	0,94±0,41	0,85±0,45	0,78±0,22

Khả năng xử lý sulfide và sinh trưởng của các chủng PNSB sau 7 ngày nuôi cấy được trình bày tại bảng 3. Theo bảng 3, các chủng PNSB sinh trưởng tốt nhất trong điều kiện 0-10 mg/l không có sự khác biệt về mật độ thống kê. Cụ thể, 10/17 chủng cho thấy sinh trưởng tốt ($OD_{660nm} \geq 1,0$) sau 7 ngày nuôi cấy gồm các chủng ND1, ND2, ND4, NH1, NH2, NH3, NH4.1, NH6, NH9.1, NH10; 7/17 chủng sinh trưởng thấp hơn ($0,7 \leq OD_{660nm} < 1,0$) gồm các chủng ND5, ND6, ND12, ND13, NH4.2, NH5, NH8. Trong khi tăng nồng độ sulfide lên 15-20 mg/l sinh trưởng của các chủng PNSB giảm đáng kể.

Điều này cho thấy, chủng PNSB có thể sử dụng được một hàm lượng sulfide nhất định để sinh trưởng. Kết quả nghiên cứu cũng tương đồng với nghiên cứu của H.T. Trong và cs (2024) [15]. Từ kết quả nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng xử lý sulfide của các chủng PNSB (bảng 4).

Bảng 4. Hiệu suất xử lý sulfide của các chủng PNSB (%).

Ký hiệu chủng	Nồng độ S ²⁻ (mg/l)		
	10	15	20
ND1	90,90 ^{abcg} ±0,33	87,23 ^{ah} ±0,09	89,87 ^{abh} ±0,11
ND2	97,76 ^{fg} ±0,03	97,54 ^{fh} ±0,03	97,36 ^{fh} ±0,04
ND4	95,61 ^{defg} ±0,04	92,95 ^{bedeh} ±0,08	92,47 ^{bedh} ±0,08
ND5	94,65 ^{cdefg} ±0,12	94,20 ^{cdefh} ±0,08	93,44 ^{bedeh} ±0,08
ND6	91,19 ^{abcdg} ±0,14	91,23 ^{abcdh} ±0,09	90,37 ^{abch} ±0,04
ND12	94,59 ^{cdefg} ±0,05	95,12 ^{defh} ±0,11	94,54 ^{cdefh} ±0,04
ND13	94,65 ^{cdefg} ±0,03	89,06 ^{abh} ±0,06	89,31 ^{abh} ±0,04
NH1	93,07 ^{bcddefg} ±0,32	88,01 ^{ah} ±0,05	87,54 ^{ah} ±0,05
NH2	93,75 ^{cdefg} ±0,02	94,77 ^{defh} ±0,12	93,92 ^{cdefh} ±0,08
NH3	90,60 ^{abcg} ±0,15	90,64 ^{abch} ±0,11	89,04 ^{abh} ±0,06
NH4.1	96,29 ^{efg} ±0,07	95,64 ^{defh} ±0,08	95,14 ^{defh} ±0,04
NH4.2	94,80 ^{defg} ±0,04	90,46 ^{abch} ±0,03	89,31 ^{abh} ±0,05
NH5	93,80 ^{cdefg} ±0,03	93,52 ^{bedeh} ±0,03	93,51 ^{bedeh} ±0,05
NH6	96,64 ^{efg} ±0,03	96,93 ^{efh} ±0,11	96,06 ^{efh} ±0,08
NH8	94,06 ^{cdefg} ±0,03	94,02 ^{cdefi} ±0,15	92,98 ^{bedeh} ±0,01
NH9.1	94,59 ^{cdefg} ±0,01	90,80 ^{abch} ±0,10	90,10 ^{abch} ±0,02
NH10	88,56 ^{ag} ±0,31	87,64 ^{ah} ±0,12	87,48 ^{ah} ±0,03

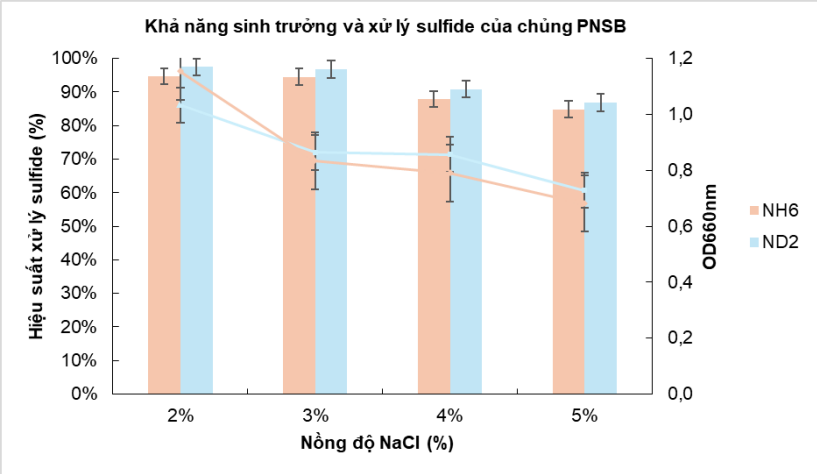
Các giá trị trong cùng bảng có các chữ cái a, b, c, d... giống nhau biểu thị khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,05).

Theo bảng 4, chủng ND2 và NH6 có khả năng xử lý sulfide cao nhất trong 17 chủng khảo sát, không có sự khác biệt sau 7 ngày nuôi cấy. Hiệu suất xử lý sulfide của chủng ND2 và NH6 lần lượt là 97,76% và 96,64% ở S²⁻ ban đầu (10 mg/l). Khi tăng S²⁻ ban đầu lên 15 mg/l, hiệu suất xử lý S²⁻ của chủng NH6 tăng nhẹ ở mức 96,93% sau đó giảm còn 96,06% ở mức S²⁻ ban đầu 20 mg/l. Hiệu suất xử lý sulfide của chủng ND2 giảm khi nồng độ S²⁻ tăng đến 15-20 mg/l nhưng vẫn duy trì ở mức cao nhất đạt 97,36% tại mức S²⁻ ban đầu 20 mg/l. Trong khi đó, chủng NH10 có hiệu suất xử lý sulfide thấp nhất đạt 88,56% ở nồng độ S²⁻ ban đầu 10 mg/l và 87,48% ở nồng độ S²⁻ ban đầu 20

mg/l sau 7 ngày nuôi cấy. Các chủng còn lại cho thấy hiệu suất xử lý sulfide cao (>90%) trong điều kiện S^{2-} ban đầu 10 mg/l, sau đó giảm dần khi nồng độ sulfide tăng đến 15-20 mg/l. Kết quả nghiên cứu cũng tương đồng với một số nghiên cứu trước đó của H.T. Trong và cs (2024) [15] và C. Hunter và cs (2009) [6] cho rằng, chủng PNSB có thể xử lý được sulfide ở một ngưỡng nhất định, nếu nồng độ sulfide tăng lên mức cao hơn có thể dẫn đến ức chế hoàn toàn hoặc gây chết tế bào, từ đó ảnh hưởng đến hiệu suất xử lý sulfide trong môi trường. Dựa vào kết quả trên, nồng độ 10 mg/l sulfide ban đầu, chủng vi khuẩn ND2 và NH6 được lựa chọn để khảo sát khả năng sinh trưởng và xử lý sulfide ở các nồng độ muối 2-5%.

3.4. Khả năng sinh trưởng và xử lý sulfide trong điều kiện muối khác nhau

Theo hình 2, chủng ND2 và NH6 sinh trưởng tốt nhất trong môi trường bổ sung 2% NaCl, giá trị OD_{660nm} lần lượt là 1,03 và 1,15. Khi tăng 3-5% NaCl, sinh trưởng của chủng ND2 và NH6 giảm. Chủng ND2 sinh trưởng tốt hơn chủng NH6 ngay cả khi nồng độ muối cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), giá trị OD_{660nm} của chủng ND2 và NH6 lần lượt đạt 0,728 và 0,681 ở 5% NaCl. Về khả năng xử lý sulfide, chủng ND2 và NH6 có khả năng xử lý sulfide cao ở 2-3% NaCl không có sự khác biệt. Tại 2% NaCl, khả năng xử lý sulfide của chủng ND2 và NH6 lần lượt đạt 97,48% và 96,40%. Hiệu suất xử lý sulfide giảm rõ rệt khi nồng độ muối tăng 4-5% ($p < 0,05$), hiệu suất xử lý sulfide của chủng ND2 và NH6 lần lượt đạt 86,79% và 84,84% trong môi trường chứa 5% NaCl. Theo kết quả trên, chủng PNSB có thể sinh trưởng và xử lý sulfide trong điều kiện muối cao. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đó rằng PNSB có thể phát triển tốt trong môi trường chứa NaCl trong khoảng 1 đến 4%; trong khi sự phát triển bị chậm lại trong môi trường chứa NaCl từ 5 đến 10% [16]. Điều này được giải thích rằng, khi gặp môi trường mặn các chủng PNSB huy động năng lượng (ATP) thông qua quang hợp để tái cấu trúc tế bào, rút ngắn kích thước, củng cố màng - vách tế bào, điều hòa thẩm thấu và kích hoạt hệ thống bảo vệ protein. Những thay đổi này giúp tế bào duy trì cân bằng nội môi và khả năng sống sót cao dưới điều kiện mặn [17]. Việc phân lập được các chủng PNSB có khả năng sinh trưởng trong điều kiện mặn cao có ý nghĩa quan trọng trong ứng dụng thực tiễn. Trong các hệ thống nuôi trồng thủy sản nước mặn, lợi các chủng PNSB chịu mặn có thể duy trì hoạt động ổn định, góp phần xử lý H_2S , NH_3 và NO_2 , từ đó cải thiện chất lượng nước, giảm stress thẩm thấu cho tôm cá, và hạn chế bùng phát dịch bệnh [18]. Ngoài ra, PNSB chịu mặn còn có thể tăng sinh khối trong môi trường mặn, ứng dụng trong sản xuất sinh khối protein vi sinh (single-cell protein), chế phẩm sinh học (probiotic) [19]. Dựa trên kết quả nghiên cứu, chủng ND2 có khả năng sinh trưởng và xử lý sulfide ở độ mặn cao và ổn định được lựa chọn để định danh đến loài.



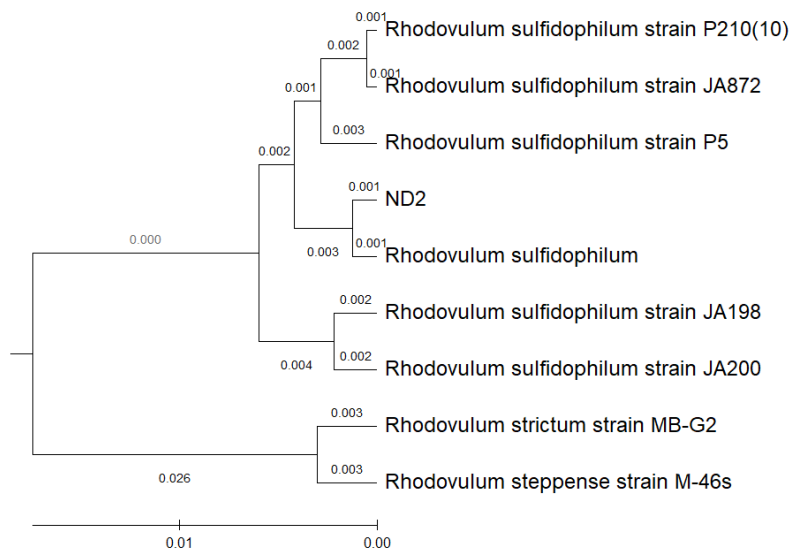
Hình 2. Kết quả đánh giá khả năng xử lý sulfide và sinh trưởng của chủng PNSB.

3.5. Kết quả định danh và xây dựng cây phân loại vi khuẩn

Chủng ND2 được giải trình tự đoạn gen *16S-rRNA* và phân tích trên NCBI. Tiến hành xác định độ tương đồng với các đoạn trình tự có sẵn trên NCBI. Kết quả cho thấy, chủng ND2 thuộc chi *Rhodovulum* với độ tương đồng 99,75% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum* (hình 3). Bằng phần mềm MEGA 11, gen *16S rRNA* từ chủng ND2 và một số loài đã công bố trên GenBank để vẽ cây phả hệ (hình 4). Như vậy, chủng vi khuẩn PNSB ND2 có thể thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum* và được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* ND2.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓ Rhodovulum sp. strain 16S_rRNA::contig_1:2086427-2087891(+) 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Rhodovulum sp.	1472	2674	99%	0.0	99.75%	1464	PQ891998.1
✓ Rhodovulum sp. HP10 chromosome, complete genome	Rhodovulum sp...	1472	8023	99%	0.0	99.75%	4104297	CP180201.1
✓ Rhodovulum sulfidophilum DSM 1374, complete genome	Rhodovulum su...	1472	7923	99%	0.0	99.75%	4132586	CP015418.1
✓ Rhodovulum sulfidophilum strain SNK001, complete genome	Rhodovulum su...	1472	7923	99%	0.0	99.75%	4082971	CP015421.1
✓ Rhodovulum sulfidophilum strain P5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Rhodovulum su...	1472	2674	99%	0.0	99.75%	1446	JF794560.2
✓ Rhodovulum sp. MB263 chromosome, complete genome	Rhodovulum sp...	1472	5348	99%	0.0	99.75%	3860570	CP020384.1
✓ Rhodovulum sp. MB263 plasmid pRSMBA, complete sequence	Rhodovulum sp...	1472	2674	99%	0.0	99.75%	238713	CP020385.1
✓ Rhodovulum sp. Nu23 partial 16S rRNA gene, isolate Nu23	Rhodovulum sp...	1472	2469	92%	0.0	99.75%	1309	LN871051.1
✓ Rhodovulum sulfidophilum strain P210(10) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Rhodovulum su...	1467	2630	99%	0.0	99.63%	1440	GU370083.2
✓ Rhodovulum sulfidophilum strain P230(5) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Rhodovulum su...	1467	2630	99%	0.0	99.63%	1439	GU370087.2
✓ Rhodovulum sulfidophilum DNA, complete genome, strain: DSM 2351	Rhodovulum su...	1467	7906	99%	0.0	99.63%	4454432	AP014800.1
✓ Rhodovulum sulfidophilum strain P230(4) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Rhodovulum su...	1467	2618	99%	0.0	99.63%	1440	GU370086.2

Hình 3. Kết quả phân tích dữ liệu NCBI phân tích định danh chính xác chủng ND2.



Hình 4. Kết quả phân tích cây phả hệ chủng ND2.

4. Kết luận

Tổng cộng 25 mẫu bao gồm 10 mẫu nước và 15 mẫu bùn thu thập từ các ao nuôi thủy sản khác nhau tại tỉnh Ninh Bình đã phân lập được 17 chủng vi khuẩn PNSB. Hai chủng ND2 và NH6 có khả năng xử lý sulfide cao trong điều kiện S^{2-} (10-20 mg/l) được lựa chọn để khảo sát khả năng sinh trưởng và xử lý sulfide trong điều kiện muối khác nhau. Chủng ND2 và NH6 sinh trưởng tốt nhất trong môi trường bổ sung 2% NaCl, giá trị OD_{660nm} lần lượt là 1,03 và 1,15. Ở nồng độ 2% NaCl giá trị OD_{660nm} của chủng NH6 tốt hơn ND2, trong khi tăng 3-5% NaCl sinh trưởng cả hai chủng đều giảm. Ngoài ra, chủng ND2 và NH6 có khả năng xử lý sulfide cao ở 2-3% NaCl và giảm dần khi tăng 4-5% NaCl. Tại 2% NaCl, khả năng xử lý sulfide của chủng ND2 và NH6 lần lượt đạt 97,48% và 96,40%. Chủng ND2 có khả năng xử lý sulfide cao hơn chủng NH6 ngay cả khi nồng độ muối cao, hiệu suất xử lý sulfide của chủng ND2 và NH6 lần lượt đạt 86,79% và 84,84% trong môi trường chứa 5% NaCl. Dựa trên kết quả đặc điểm hình thái, khuẩn lạc, phân tích trình tự gen, chủng ND2 được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* ND2. Chủng *Rhodovulum sulfidophilum* ND2 có tiềm năng xử lý sulfide hiệu quả, từ đó được ứng dụng xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản góp phần cải thiện chất lượng môi trường nuôi thủy sản, giúp giảm rủi ro bệnh tật. Chủng *Rhodovulum sulfidophilum* ND2 tiềm năng được đề nghị tiếp tục nghiên cứu để tối ưu điều kiện môi trường nâng cao sinh khối định hướng sản xuất chế phẩm sinh học xử lý nước trong nuôi trồng thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ Công ty TNHH Tập đoàn Sinh học AQ. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Seangtumnor, D. Kantachote, P. Nookongbut, et al. (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, DOI: 10.1016/J.BCAB.2018.02.013.
- [2] K. Mukkata, D. Kantachote, B. Wittayaweerasak, et al. (2016), “Diversity of purple nonsulfur bacteria in shrimp ponds with varying mercury levels”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **23(4)**, pp.478-487, DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.05.014.
- [3] D. Thulasi, M. Moturi, R. Saraswathy (2020), “Effect of sulphide in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* under varying oxygen and pH levels”, *Aquaculture Research*, **51**, DOI: 10.1111/are.14582.
- [4] F. Torun, B. Hostins, J. Teske, et al. (2020), “Nitrate amendment to control sulphide accumulation in shrimp ponds”, *Aquaculture*, **521**, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735010.
- [5] S. Chumpol, D. Kantachote, T. Nitoda, et al. (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, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.02.033.
- [6] C. Hunter, F. Daldal, M.C. Thurnauer, et al. (2009), *The Purple Phototrophic Bacteria*, DOI: 10.1007/978-1-4020-8815-5.
- [7] R. Coico (2005), “Gram staining”, *Curr. Protoc. Microbiol.*, **Appendix 3, Appendix 3C**, DOI: 10.1002/9780471729259.mca03cs00.
- [8] E.I. Madukasi, H. Chunhua, G. Zhang (2011), “Isolation and application of a wild strain photosynthetic bacterium to environmental waste management”, *International Journal of Environmental Science & Technology*, **8(3)**, pp.513-522, DOI: 10.1007/BF03326237.
- [9] N.R. Krieg, J.G. Holt (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, London.
- [10] S. Yuli, L. Chengxu, B. Mauricio, et al. (2005), “Evaluation of 16S rRNA sequencing and reevaluation of a short biochemical scheme for identification of clinically significant bacteroides species”, *Journal of Clinical Microbiology*, **43(4)**, pp.1531-1537, DOI: 10.1128/jcm.43.4.1531-1537.2005.
- [11] T.V. Quyen, T.H. Khang, T.V. Be (2022), “Isolating, selecting and identifying purple nonsulfur bacteria, and testing the sulfide handling ability of purple

nonsulfur bacteria in shrimp pond water in Kien Luong district, Kien Giang province”, *Journal of Industry and Trade*, **10**, pp.380-386, <https://tapchicongthuong.vn/phan-lap--tuyen-chon-va-dinh-danh-vi-khuan-tia-khong-luu-huynh--thu-nghiem-kha-nang-xu-ly-sulfide-trong-nuoc-ao-nuoi-tom-tai-huyen-kien-luong--tinh-kien-giang-89493.htm>, accessed 10 February 2025 (in Vietnamese).

[12] J.F. Imhoff, H.G. Truper (1989), “*The purple nonsulfur bacteria*”, *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, pp.1658-1680.

[13] H.T. Yen, T.T.T. Quynh, C.H. Ha, et al. (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)**, DOI: 10.15625/2525-2518/57/6/13711.

[14] A. Srinivas, B.V. Kumar, B.D. Sree, et al. (2014), “*Rhodovulum salis* sp. nov. and *Rhodovulum viride* sp. nov., phototrophic Alphaproteobacteria isolated from marine habitats”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64(3)**, pp.957-962, DOI: 10.1099/ij.s.0.058974-0.

[15] H.T. Trong, T.P.T. Hoang, V.T.Q. Thang, et al. (2024), “Isolation and selection of purple non-sulfur photosynthetic bacteria strains capable of sulfide treatment in aquacultural water environment in Dong Hoa town, Phu Yen province”, *National Scientific Conference on Biotechnology*, pp.836-846 (in Vietnamese).

[16] C. Matsuo, M. Abo, A. Okubo, et al. (2001), “Identification of osmotic regulators in halophilic photosynthetic bacteria by NMR and capillary electrophoresis”, *Analytical Sciences*, **17**, pp.1601-1604.

[17] N. Kanno, K. Matsuura, S. Haruta (2014), “Differences in survivability under starvation conditions among four species of purple nonsulfur phototrophic bacteria”, *Microbes Environ.*, **29(3)**, pp.326-328, DOI: 10.1264/jsme2.ME14013.

[18] S. Wasai, N. Kanno, K. Matsuura, et al. (2018), “Increase of salt tolerance in carbon-starved cells of *Rhodospirillum rubrum* depending on photosynthesis or respiration”, *Microorganisms*, **6(1)**, DOI: 10.3390/microorganisms6010004.

[19] H. Miyasaka, A. Koga, Y. Tani, et al. (2021), “The effects of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* on the growth and survival rate of *Marsupenaeus japonicus* (kuruma shrimp)”, *SDRP Journal of Aquaculture, Fisheries & Fish Science*, **3(2)**, pp.245-249, DOI: 10.25177/JAFFS.3.2.RA.10713.