

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT THỂ THỰC KHUẨN ĐẶC HIỆU CHO VI KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TRÊN TÔM

Nguyễn Thành Thắng¹, Mai Thị Hồng Nhung¹, Nguyễn Thành Trung³,
Nguyễn Thanh Hòa^{1,2}, Trương Quốc Phong^{1,2*}

¹Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

²Viện Khoa học và Công nghệ Sức khỏe, Đại học Bách khoa Hà Nội

³Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia

TÓM TẮT

Vibrio parahaemolyticus là tác nhân chính gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - hội chứng AHPND) trên tôm, với tỉ lệ tử vong có thể lên đến trên 90%. Từ đầu năm 2023 đến nay, cả nước có trên 1.612 ha tôm nuôi bị thiệt hại trong đó 688 ha bị thiệt hại do dịch bệnh, chủ yếu là do bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Các biện pháp điều trị truyền thống như các loại kháng sinh phổ rộng dần tỏ ra kém hiệu quả khi tình trạng kháng kháng sinh ở *Vibrio parahaemolyticus* ngày càng nghiêm trọng. Thể thực khuẩn (Bacteriophage) đang nổi lên như một biện pháp an toàn, thân thiện và bền vững trong việc kiểm soát vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* M1 đã được phân lập từ mẫu nước ao nuôi xuất hiện bệnh lý hoại tử gan tụy ở tôm và được định danh bằng các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh học phân tử. Nhóm nghiên cứu đã phân lập được thể thực khuẩn VP2 đặc hiệu chủng *V. parahaemolyticus* và xác định được một số đặc tính như độ bền nhiệt (-20°C – 70°C), pH 4-10; đặc hiệu vật chủ và không có khả năng ly giải một số chủng như *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*.

Từ khóa: Phân lập, thể thực khuẩn, hoại tử gan tụy cấp, tôm, *Vibrio parahaemolyticus*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vibrio parahaemolyticus là một loại vi khuẩn ưa mặn, Gram âm được tìm thấy trong môi trường cửa sông, biển và ven biển. *V. parahaemolyticus* là tác nhân hàng đầu gây bệnh viêm dạ dày ruột cấp tính ở người (Letchumanan *et al.*, 2014). *V. parahaemolyticus* không chỉ gây bệnh cho người mà còn cho cả thủy sản. Các chủng độc lực của loài vi khuẩn này là mối đe dọa lớn đối với sự sống sót của tôm, một trong những sản phẩm quan trọng nhất trong ngành nuôi trồng thủy sản trên toàn thế giới. *V. parahaemolyticus* là tác nhân chính gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) hoặc hội chứng chết sớm (EMS) ở tôm, với tỷ lệ chết rất cao và gây thiệt hại kinh tế lớn (Kumar *et al.*, 2021). Biện pháp điều trị và dự phòng cơ bản đối với *V. parahaemolyticus* là sử dụng các loại kháng sinh.

Trong vài thập kỷ qua, *V. parahaemolyticus* kháng thuốc kháng sinh đã gia tăng do sử dụng quá nhiều kháng sinh trong nông nghiệp và nuôi trồng thủy sản. Hầu hết các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập đều có mức độ kháng thuốc cao với streptomycin, cefazolin và ampicillin, gây ra những mối đe dọa và thách thức đặc biệt nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng và các vấn đề kinh tế trên toàn thế giới (Elias *et al.*, 2023). Thể thực khuẩn (bacteriophage) là virus của vi khuẩn, chỉ lây nhiễm các tế bào vi khuẩn đặc hiệu. Thể thực khuẩn có mặt ở khắp mọi nơi và được biết đến là sinh vật phong phú nhất với 10^{31} đơn vị trên bề mặt Trái đất (Clokier *et al.*, 2011). Thể thực khuẩn thường có tính đặc thù theo ký chủ cao, chỉ tác dụng lên các loài hoặc thậm chí là các chủng nhất định. Bên cạnh đó, tính đặc hiệu cao của thể thực khuẩn có thể giảm thiểu sự ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi. Do vi khuẩn kháng kháng sinh ngày càng gia tăng và thiếu hụt các loại kháng sinh mới, liệu pháp thể thực khuẩn (phage therapy) đang trở nên ngày càng phổ biến do khả năng tiêu diệt vi khuẩn đặc hiệu và hiệu quả của chúng. Hiện nay, thể thực khuẩn được sử dụng rộng rãi như một tác nhân kiểm soát sinh học trong ngành công nghiệp thực phẩm và nông nghiệp, xử lý nước thải và nuôi trồng thủy sản (Plaza *et al.*, 2018)..

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* từ mẫu nước ở đầm tôm bị nhiễm bệnh tại Hải Phòng, phân lập thể thực khuẩn đặc hiệu cho vi khuẩn và khảo sát đặc tính của thể thực khuẩn làm cơ sở cho các nghiên cứu thử nghiệm cho việc phòng trị bệnh này trên tôm.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Môi trường

Môi trường ASPW (2% Peptone, 2% NaCl) được sử dụng trong phân lập vi khuẩn. Môi trường TCBS (Thiosulfate

Citrate Bile Sucrose)-Himedia, Ấn Độ sử dụng để nuôi cấy khuẩn lạc. Môi trường Hicrome - Himedia, Ấn Độ. Môi trường MLB, MLB 2X 1mM NaCl (Peptone, Yeast extract, NaCl, CaCl₂) dùng để hoạt hóa vi khuẩn. Môi trường Glucose Fermentation Broth 1% pepton, 3% NaCl, 1% Lactose và 0,8% phenol red, pH 7,4) sử dụng trong kiểm chứng đặc tính hóa sinh của *Vibrio parahaemolyticus*. Môi trường Lactose Fermentation Broth (1% pepton, 3% NaCl, 1% Lactose và 0,8% phenol red, pH 7,4) sử dụng trong kiểm chứng đặc tính hóa sinh của *Vibrio parahaemolyticus*. Môi trường LB (Luria Bertani) (1% tryptone, 0,5% cao nấm men, 3% NaCl) sử dụng trong nuôi cấy vi khuẩn bằng khuếch tán đĩa thạch.

Các chủng vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được từ mẫu nước đầm tôm được lấy từ đầm nuôi tôm thẻ chân trắng ở Tân Thành, Dương Kinh, Hải Phòng và mẫu bể chứa tôm được lấy từ các bể chứa tôm ở chợ Long Biên dùng để nghiên cứu. Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* BL được cung cấp từ công ty Trúc Anh Biotech, Bạc Liêu được sử dụng để phân lập thể thực khuẩn. Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia được dùng để làm mẫu đối chứng cho các thí nghiệm định danh, đặc tính hóa sinh... Các chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Proteomics – Trung tâm nghiên cứu và phát triển Công nghệ Sinh học – Trường Hóa và Khoa học sự sống – Đại học Bách khoa Hà Nội được sử dụng để làm các thí nghiệm khả năng ly giải của thể thực khuẩn đặc hiệu cho *V. parahaemolyticus*.

Phương pháp

Phân lập vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* từ mẫu nước đầm tôm

Các mẫu nước đầm tôm tại Hải Phòng được thu thập vào tháng 2/2023 và phân lập *V. parahaemolyticus* theo phương pháp được mô tả của Siddique và đồng tác giả (2021). Các thí nghiệm sinh hóa để khẳng định thêm được thực hiện theo tiêu chuẩn ISO 21872-1:2017.

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số từ các chủng vi khuẩn *Vibrio* được tách chiết bằng phương pháp chiết muối theo mô tả của Miller và đồng tác giả (1988) có cải tiến (Miller *et al.*, 1988). Vi khuẩn *Vibrio* sau khi được nuôi tăng sinh trong môi trường ASPW qua đêm tạo thành dung dịch huyền phù. Dung dịch huyền phù (2 mL) của *Vibrio* được cho vào ống eppendorf 1,5 mL, ly tâm 8.000 vòng/phút trong 5 phút để thu sinh khối. Cho 500 µL lysis buffer (0.15 M NaCl, 400 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM EDTA, 1% SDS, pH 8.0) vào từng ống eppendorf chứa sinh khối vi khuẩn, vortex để trộn mẫu. Mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút (cứ sau 5 phút, quay ngược ống để trộn mẫu). Tiếp đến, bổ sung 170 µL CH₃COONa 5M vào từng ống, vortex để trộn mẫu, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi. Bổ sung hỗn hợp CIAA (24 chloroform : 1 isoamyl alcohol) theo tỉ lệ 1:1 với dịch nổi. Tiến hành ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Sau khi ly tâm, dịch nổi phía trên được chuyển sang ống eppendorf 1,5 mL mới, isopropanol được bổ sung theo tỷ lệ 1:1. Hỗn hợp này được ủ trong đá lạnh trong 1 giờ để kết tủa DNA. Mẫu sau khi ủ được ly tâm 12.000 vòng/phút ở trong 20 phút để thu tủa. Tủa DNA sau đó được rửa bằng cồn 70%, làm khô và hoà tan trong nước loại ion. DNA tổng số của *Vibrio* được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Định danh *Vibrio parahaemolyticus* bằng chỉ thị phân tử 16S rRNA

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn *Vibrio* được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với cặp primer đặc hiệu khuếch đại đoạn gen 16S rRNA: 27F-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R-5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' để khuếch đại đoạn gen 16S rRNA có kích thước 1500 bp. Thành phần phản ứng PCR gồm: 5 mL 5X buffer, 2 mL dNTPs, 1,5 mL hỗn hợp primer, 2 mL DNA tổng số (80 ng); 14,25 mL nước cất vô trùng. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Biorad, Mỹ) theo chu trình: 35 chu kỳ: 98 °C/8 giây, 55 °C/5 giây, và 72 °C/1 phút 30 giây; cuối cùng 72 °C/6 phút. Sản phẩm PCR đối với gen 16S rRNA được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra chất lượng trước khi gửi mẫu đi phân tích trình tự DNA. Gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm RedSafe và quan sát dưới ánh sáng huỳnh quang bằng máy Gel Doc™ XR (Bio-Rad, Mỹ). Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA được gửi đến Công ty 1st Base (Malaysia) để giải trình tự theo phương pháp sử dụng các dideoxynucleotide của Sanger. 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.

Phân lập thể thực khuẩn

Thể thực khuẩn được phân lập từ các mẫu nước thải thu thập tại chợ Long Biên ở thành phố Hà Nội bằng phương pháp đã được mô tả bởi Van Twest và Kropinski (2009) có cải tiến (Van, Kropinski, 2009). Các mẫu nước thải được ly tâm 8000 x g trong 10 phút và thu dịch nổi. Sau đó, 5 mL dịch nổi được trộn với 5 mL MLB nồng độ 2X vô trùng (1 mM CaCl₂) và 100 µL dịch nuôi cấy *V. parahaemolyticus* (OD 600 = 0,6). Các hỗn hợp được ủ lắc qua đêm ở 37 °C. Sau khi ủ, các hỗn hợp được ly tâm ở 8000x g trong 5 phút và phần dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,22 µm. Phương pháp thạch hai lớp được sử dụng để phân lập các vết tan riêng rẽ (Kropinski *et al.*, 2009). Quy trình đổ thạch hai lớp được lặp lại 3 lần để tinh sạch thể thực khuẩn.

Khảo sát thể thực khuẩn

Hiệu quả ly giải của thể thực khuẩn được khảo sát theo phương pháp của Kalatzis và đồng tác giả (2016). Nuôi cấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đến pha log ($\sim 10^6$ CFU/mL) sau đó bổ sung thể thực khuẩn theo tỉ lệ MOI 0,1, 1, 10 hoặc 100. Mẫu vi khuẩn không được bổ sung thể thực khuẩn được nuôi cấy song song để làm mẫu kiểm chứng. Tất cả các mẫu đều được nuôi cấy trong tủ lắc ở 37°C trong 14 giờ. Mật độ quang học ở bước sóng 660 nm (OD_{660nm}) được ghi lại hàng giờ để đánh giá sự phát triển của vi khuẩn. Tác dụng ly giải của thể thực khuẩn đối với vi khuẩn chủ được ước tính từ việc giảm sự phát triển của vi khuẩn.

Phổ vật chủ của thể thực khuẩn được khảo sát dựa vào phương pháp spot test trên bề mặt thạch hai lớp theo mô tả của Elizabeth Kutter (2009). Thí nghiệm được thực hiện với các chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802, *Vibrio cholerae* ATCC 14733, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*.

Tỉ lệ lây nhiễm (MOI) tối ưu được xác định theo phương pháp của Yu và đồng tác giả (2013) có cải biến. Nuôi cấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đến pha log (khoảng 10^6 CFU/mL), bổ sung thể thực khuẩn ở các tỷ lệ MOI 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10. Hỗn hợp được nuôi lắc ở 37°C, 6 giờ. Sau đó, ly tâm hỗn hợp ở 8000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi thu được được lọc qua màng lọc 0,22 µm. Hiệu giá thể thực khuẩn được xác định bằng phương pháp đổ thạch 2 lớp.

Các điều kiện ảnh hưởng tới thực khuẩn thể

Độ ổn định nhiệt độ và pH được thử nghiệm theo phương pháp do Tan và đồng tác giả (2021) mô tả với một số sửa đổi (Tan *et al.*, 2021). Độ ổn định nhiệt độ của thực khuẩn thể trong đệm SM đã được thử nghiệm ở các nhiệt độ khác nhau (-20, 25, 37, 50, 60 và 70°C) và ủ trong 1 giờ. Đối với độ ổn định pH, thực khuẩn thể được ủ ở các khoảng pH khác nhau (pH 2, 4, 6, 8, 10 và 12) trong 1 giờ bằng cách trộn 900 µL môi trường MLB đã được điều chỉnh pH với 100 µL dịch thể thực khuẩn, ủ trong 1 giờ. Sau khi ủ, hiệu giá thực khuẩn thể được xác định bằng phương pháp thạch hai lớp

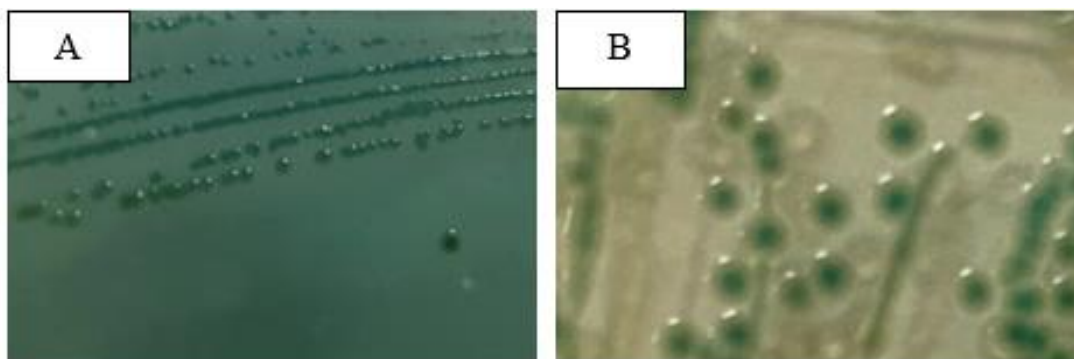
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập *Vibrio parahaemolyticus*

Năm mẫu nước đầm tôm mắc dịch AHPND đã được sử dụng để phân lập vi khuẩn *Vibrio* trên môi trường TCBS và môi trường Hicrome. Các chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường TCBS có khuẩn lạc hình tròn, trơn nhẵn, bờ đều, màu xanh, đường kính 2–3 mm, phát triển trên môi trường Hicrome có khuẩn lạc hình tròn, trơn nhẵn tâm màu xanh ngọc và viền không màu (Hình 1). Chúng là các vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn, có khả năng di động trong môi trường lỏng, lên men glucose và lactose, phát triển tốt trong 2-8% NaCl và không phát triển ở 0% và 10% NaCl. Dựa theo Tiêu chuẩn quốc gia ISO 21872-1:2017, bước đầu chúng tôi đã lựa chọn được 2 chủng *Vibrio* và đặt tên là M1, M3 để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Định danh *Vibrio parahaemolyticus* bằng chỉ thị phân tử 16S rRNA

Để định danh các chủng vi khuẩn *V. parahemolyticus* dựa trên chỉ thị phân tử 16S rRNA, bước đầu tiên là tách chiết DNA tổng số của các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. đã thu được. Gen 16S rRNA của các chủng được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp primer đặc hiệu như đã trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra. Kết quả BLAST trên GenBank cho thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. M1 tương đồng 99,36% với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, 99,22% với vi khuẩn *Vibrio neocaledonicus* và *Vibrio alginolyticus*. Kết hợp với các đặc điểm sinh hóa, có thể kết luận *Vibrio* sp. M1 thuộc loài vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*.



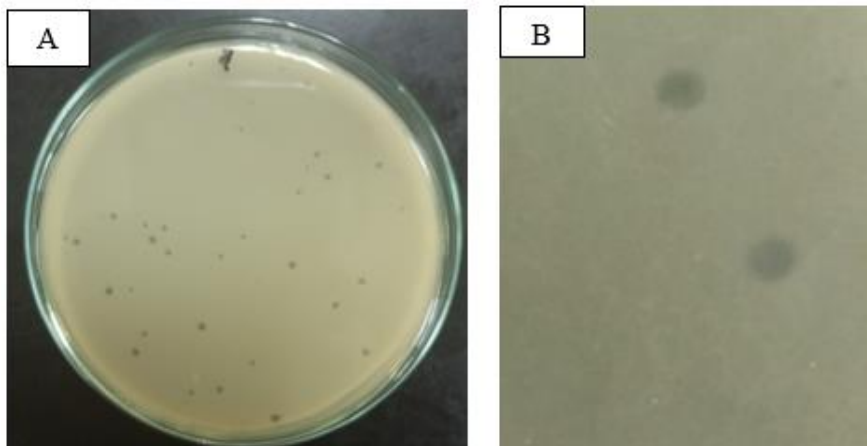
Hình 1. Các khuẩn lạc *Vibrio* trên môi trường TCBS (A); Các khuẩn lạc *Vibrio* trên môi trường Hicrome (B)

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus strain VPD14 chromosome 1 complete sequence	Vibrio parahaemolyticus	2532	27708	99%	0.0	99.36%	3291121	CP031781.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus strain FDAARGOS_191 chromosome 1 complete sequence	Vibrio parahaemolyticus	2532	27695	99%	0.0	99.36%	3295711	CP020427.2
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633 DNA chromosome 1 complete sequence	Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633	2532	25214	99%	0.0	99.36%	3288558	BA000031.2
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus strain TY-41 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Vibrio parahaemolyticus	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1419	MT550813.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio neonatus strain 5-B 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Vibrio neonatus	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1453	MN939469.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K118 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Vibrio alginolyticus	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1432	MN826467.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. strain 201709CJKOP-47 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Vibrio sp.	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1452	MG867498.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. strain 201709CJKOP-46 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Vibrio sp.	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1453	MG867497.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio sp. strain 201709CJKOP-24 16S ribosomal RNA gene partial sequence	Vibrio sp.	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1455	MG867475.1

Hình 2. So sánh kết quả giải trình tự gene 16s RNA của chủng Vibrio sp. M1 trên cơ sở dữ liệu Blast

Kết quả phân lập và phổ vật chủ của thể thực khuẩn

Thể thực khuẩn được phân lập từ nước thải bằng cách sử dụng *V. parahaemolyticus* BL làm vật chủ, được đặt tên là VP2. Nó có thể tạo thành các vết tan trong suốt có đường kính khoảng 2–3 mm (Hình 3).



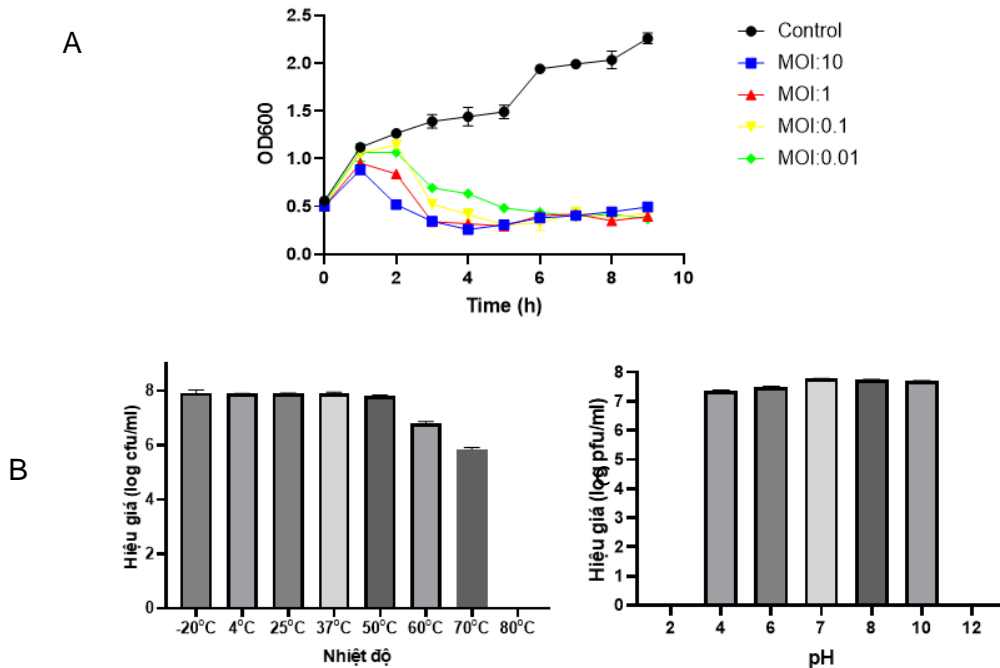
Hình 3. Kết quả phân lập thể thực khuẩn VP2 (A) Hình thái vết tan thể thực khuẩn VP2 (B)

Cả 2 chủng *V. parahaemolyticus* M1 và ATCC 17802, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* đã được sử dụng để đánh giá phạm vi vật chủ của thể thực khuẩn VP2. Trong các thử nghiệm spot test, VP2 tạo thành các vùng ly giải rõ ràng trên tất cả các chủng *V. parahaemolyticus* cho thấy các chủng này nhạy cảm với thể thực khuẩn. Thể thực khuẩn không ly giải vi khuẩn nào khác với loài *V. parahaemolyticus* cho thấy tính đặc hiệu cao của thể thực khuẩn với loài vi khuẩn này.

Kết quả khảo sát khả năng ly giải và độ bền của thể thực khuẩn

Tại MOI 1 mật độ thể thực khuẩn VP2 đạt giá trị cao nhất (khoảng 3.1×10^9 PFU/ml) sau 6 giờ thí nghiệm. Với MOI 0,001; 0.01; 0.1; 10 đều thấy được có sự nhân lên của thể thực khuẩn tuy nhiên chưa đạt giá trị cao, đặc biệt tại MOI 10 có thể thấy lượng thể thực khuẩn tăng lên chỉ vào khoảng 1 log sau 6 giờ thử nghiệm, thấp nhất trong các tỷ lệ được khảo sát. Điều này thể hiện mặc dù lượng thể thực khuẩn lớn hơn số tế bào chủ nhưng sự xâm nhiễm tế bào lại không đạt hiệu quả.. Theo Kasman và đồng tác giả(2002), tuy nồng độ vi khuẩn không ảnh hưởng đến việc nhân lên của thể thực khuẩn thể nhưng ở số lượng thể thực khuẩn đầu vào cao hơn số lượng tế bào vi khuẩn kí chủ thì số lượng thể thực khuẩn thế hệ sau được sinh ra thấp. Khi một thể thực khuẩn độc lực xâm nhập vào tế bào chủ, nó sẽ nhân lên và ly giải tế bào, dẫn đến sự bùng phát các hạt virus. Do đó, với mỗi lần ly giải tế bào chủ, số lượng thể thực khuẩn sẽ tăng lên. Tuy nhiên, nếu tỷ lệ thể thực khuẩn cao có thể ly giải vi khuẩn mà không có sự nhân lên của thể thực khuẩn. Trong quá trình ly giải mà không có sự nhân lên, thể thực khuẩn hấp thụ vào bề mặt của tế bào chủ ở tỷ lệ MOI cao (> 100) và ly giải tế bào chủ tại nhiều vùng bề mặt tế bào dẫn đến cái chết của vật chủ giống như sự ly giải. Tỷ lệ MOI thấp có lợi cho tính khả thi thương mại của ứng dụng quy mô lớn vì nó làm giảm chi phí chuẩn bị, tinh sạch và ứng dụng của thể thực khuẩn.

Để xác định hoạt động tiêu diệt vi khuẩn của thể thực khuẩn VP2, *V. parahaemolyticus* M1 đã được nhiễm thể thực khuẩn VP2 ở MOI là 0,01, 0,1, 1 và 10, ủ lactic ở 37°C. Các mẫu nuôi được thu thập mỗi 1 giờ trong 9 giờ và sự phát triển của vi khuẩn được đo dựa trên OD600, cho thấy sự phát triển của *V. parahaemolyticus* bị ức chế khi đồng nuôi cấy với thể thực khuẩn theo cách phụ thuộc vào nồng độ, với các giá trị OD_{600nm} giảm nhanh hơn ở MOI 10 so với MOI 0,01, 0,1 hoặc 1 (Hình 4A), OD_{600nm} tăng trở lại sau 8 giờ cho thấy sự xuất hiện các vật chủ không nhạy cảm với thể thực khuẩn. Đối với các điều kiện nhiệt độ, thể thực khuẩn VP2 có tính ổn định cao ở dải nhiệt độ từ -20°C đến 50°C. Hiệu giá thể thực khuẩn bắt đầu giảm mạnh ở 60°C, giảm mạnh nhất ở 80°C (thể thực khuẩn bị bất hoạt hoàn toàn) sau 1 giờ ủ (Hình 4B) Thể thực khuẩn VP2 ổn định từ pH 4 đến 10 trong các thí nghiệm về độ nhạy pH và bị bất hoạt hoàn toàn ở pH 2 và 12 (Hình 4C). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Jingyun Fu và đồng tác giả (2023), các tác giả này cũng chỉ ra rằng thể thực khuẩn vB_ValM_PVA8 không thay đổi nhiều về mật độ và ổn định ở dải pH tương đối rộng 4 – 10 (Fu et al., 2023).



Hình 4. Hiệu quả ly giải của VP2 (A) Hiệu giá VP2 sau 1 giờ ủ ở các nhiệt độ khác nhau (B) Hiệu giá VP2 sau 1 giờ ủ ở các pH khác nhau (C)

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được vi khuẩn M1 từ nước đầm nuôi tôm. Một số đặc tính của chủng M1 như hình thái khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc, kết quả nhuộm gram, khả năng chịu mặn,... phù hợp với đặc điểm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Chủng M1 được định danh là *Vibrio parahaemolyticus* dựa vào trình tự 16S rRNA với mức độ tương đồng lớn hơn 99%. Sử dụng chủng *V. parahaemolyticus* M1, chúng tôi đã phân lập thể thực khuẩn VP2 với khả năng xâm nhiễm và ly giải *V. parahaemolyticus*, đồng thời xác định được một số đặc tính (khả năng chịu điều kiện nhiệt đến 70°C, ổn định trong dải nhiệt độ từ -20°C đến 70°C và pH 4 – 10). Nghiên cứu đã cho thấy thể thực khuẩn VP2 đặc hiệu vật chủ và không có khả năng ly giải một số chủng như *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* (số liệu không thể hiện). Nhóm nghiên cứu sẽ tiếp tục nghiên cứu về khả năng tiêu diệt vi khuẩn của thể thực khuẩn VP2 ở môi trường thực tế. Thể thực khuẩn VP2 có thể được sử dụng để điều trị dự phòng các vùng nuôi trồng bị nhiễm dịch hoặc bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để kiểm soát lượng vi khuẩn. Những kết quả thu được sẽ là tiền đề cho việc ứng dụng thể thực khuẩn trong điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Letchumanan V, Chan KG, Lee LH (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front Microbiol*, 5:705.
- Kumar V, Roy S, Behera BK, Bossier P, Das BK (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins (Basel)*, 13.
- Elias NA, Abu Hassan MS, Yusoff NAH, Tosin OV, Harun NA, Rahmah S, Hassan M (2023). Potential and limitation of biocontrol methods against vibriosis: a review. *Aquaculture International* 31(4): 2355–98.
- Clokie MRJ, Millard AD, Letarov A V, Heaphy S (2011). *Phages in nature*. *Bacteriophage*, 1:31.

- Plaza N, Castillo D, Pérez-Reytor D, Higuera G, García K, Bastías R (2018). Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31: 24–33.
- Siddique AB, Moniruzzaman M, Ali S, Dewan MN, Islam MR, Islam MS, Amin MB, Mondal D, Parvez AK, Mahmud ZH (2021). Characterization of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolated From Fish Aquaculture of the Southwest Coastal Area of Bangladesh. *Front Microbiol*, 12:635539.
- Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. *Methods Mol Biol*, (501), 69-76.
- Kutter E. (2009). Phage Host Range and Efficiency of Plating. *Methods Mol Biol*, (501): 141-149.
- Yu YP, Gong T, Jost G, Liu WH, Ye DZ, Luo ZH (2013). Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. *FEMS Microbiol Lett*, 348:112–9.
- Tan CW, Rukayadi Y, Hasan H, Abdul-Mutalib NA, Jambari NN, Hara H, Thung TY, Lee E, Radu S (2021). Isolation and Characterization of Six *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Bacteriophages From Seafood Samples. *Front Microbiol*, 12.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SPECIFIC BACTERIOPHAGES FOR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BACTERIA CAUSING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE IN SHRIMP

Nguyễn Thành Thắng¹, Mai Thị Hồng Nhung¹, Nguyễn Thành Trung³,
Nguyễn Thanh Hòa^{1,2}, Trương Quốc Phong^{1,2}

¹School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

²Institute of Health Science and Technology, Hanoi University of Science and Technology

³National Institute For Food Control

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is the main agent causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp, with a mortality rate that can exceed 90%. From the beginning of 2023 until now, more than 1,612 hectares of farmed shrimp have been damaged nationwide, of which 688 hectares have been damaged due to disease, mainly due to acute hepatopancreatic necrosis. Traditional treatment measures such as broad-spectrum antibiotics are gradually showing less effectiveness as the antibiotic resistance situation in *Vibrio parahaemolyticus* becomes increasingly serious. Bacteriophages are emerging as a safe, friendly, and sustainable measure in controlling bacteria. In this study, the *V. parahaemolyticus* M1 strain was isolated from a pond water sample where hepatopancreatic necrosis appeared in shrimp and identified by morphological, physiological, and molecular biological characteristics. The bacteriophage specific to the *V. parahaemolyticus* strain named VP2, was isolated and some characteristics were determined such as temperature stability (-20°C – 70°C), pH 4-10; host specificity to *V. parahaemolyticus*. It does not have the ability to infect some strains such as *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*.

Keywords: Isolation, bacteriophage, acute hepatopancreatic necrosis, shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*.

* Author for correspondence: Tel: +84-988793468; Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn