

**Phân lập thực khuẩn thể có hoạt tính ly giải vi khuẩn
Aeromonas hydrophila gây bệnh trên cá điêu hồng nuôi lồng bè ở tỉnh Vĩnh Long**
**Isolation of bacteriophages capable of lysis by *Aeromonas hydrophila* causing
disease on red tilapia from cages in Vinh Long Province**

Quách Văn Cao Thi^{1*}, Nguyễn Bảo Trung², Nguyễn Phương Thúy³

¹Trường Đại Học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long, Thành phố Vĩnh Long, Việt Nam

²Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Thành phố Cần Thơ, Việt Nam

³Trường Đại học Trà Vinh, Thành phố Trà Vinh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: thiqvc@vlute.edu.vn

THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.20.1.3466.2025

Ngày nhận: 03/06/2024

Ngày nhận lại: 24/07/2024

Duyệt đăng: 09/08/2024

TÓM TẮT

Aeromonas hydrophila (*A. hydrophila*) là một trong những vi khuẩn gây bệnh và làm tổn thất đáng kể cho nghề nuôi cá ở nhiều nước trên thế giới và ở Việt Nam. Nhiều giải pháp điều trị bệnh khác nhau đã được áp dụng nhưng việc kiểm soát vi khuẩn này vẫn còn gặp nhiều hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập được thể thực khuẩn (TKT/phage) có khả năng ly giải vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh xuất huyết trên cá điêu hồng nuôi lồng bè ở tỉnh Vĩnh Long. Từ mẫu gan, thận và tỳ tạng của cá điêu hồng, nghiên cứu đã phân lập được tổng số 10 dòng TKT. Hầu hết các dòng TKT đều có thể ký sinh trên nhiều chủng vi khuẩn *A. hydrophila* được phân lập trong nghiên cứu. Dựa vào hình thái dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), chủng TKT ΦA3 có phổ ký chủ nhiều nhất được xác định thuộc họ *Peduoviridae* (trước đây là họ *Myoviridae*). Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng TKT trong việc kiểm soát vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá điêu hồng.

ABSTRACT

Từ khóa:

Aeromonas hydrophila;
bệnh xuất huyết; cá điêu hồng;
phổ ký chủ; thực khuẩn thể

Keywords:

Aeromonas hydrophila;
bacteriophage; hemorrhagic
disease; host range; red tilapia

Aeromonas hydrophila (*A. hydrophila*) is one of the bacteria that causes enormous damage to fish farmers worldwide and in Vietnam. Various treatment measures have been applied, but controlling these bacteria faces difficulties. Therefore, this study was conducted to isolate a bacteriophage (phage) capable of lysis from *A. hydrophila* that causes hemorrhagic disease in cage-raised red tilapia in Vinh Long province. A total of 10 phages were obtained from the liver, kidney, and spleen of diseased red tilapia (*Oreochromis* sp.). The findings revealed that most phages have a broad host range in the *A. hydrophila* strains isolated in the study. Based on morphological characteristics under Transmission Electron Microscopy (TEM), phage ΦA3 with the broadest host range belongs to the *Peduoviridae* family (formerly *Myoviridae*). The results show the potential for applying phages to control pathogenic bacteria in red tilapia.

1. Giới thiệu

Do đặc tính dễ nuôi, mau lớn, chất lượng thịt thơm ngon, và có giá trị dinh dưỡng cao (Siddiqui & Al-Harbi, 1995; Zonneveld & Fadholi, 1991) và là đối tượng có tiềm năng xuất khẩu trong tương lai nên cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) là đối tượng thủy sản được nuôi chủ yếu ở cù lao Anh Bình, huyện Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long. Tuy nhiên, do có nhiều hộ nuôi cùng với mật độ cao đã gây ra nhiều tác động xấu đến môi trường ao nuôi và các rủi ro có thể xảy ra do dịch bệnh bùng phát. Bệnh xuất huyết do vi khuẩn *A. hydrophila* là một trong những bệnh thường hay xuất hiện và gây thiệt hại lớn cho nghề nuôi cá điêu hồng lồng bè (Tran & ctg., 2017). Bệnh xuất hiện thường xuyên trong các tháng mùa mưa và các tháng giao mùa với tỷ lệ nhiễm bệnh là 47.25% và tỷ lệ chết có thể lên đến 84% (Tran & ctg., 2017). Để điều trị bệnh, người nuôi đã sử dụng thuốc kháng sinh nhưng không theo khuyến cáo nên làm vi khuẩn tăng khả năng kháng thuốc và hiệu quả điều trị giảm. Do đó, việc xuất hiện bệnh vẫn phổ biến, cá bệnh có xu hướng làm nặng hơn và việc điều trị cũng khó khăn hơn trước đây. Do đó, các biện pháp thay thế vừa hiệu quả và an toàn trong phòng trị bệnh thủy sản, có thể hạn chế việc sử dụng kháng sinh là trở ngại lớn cho người nuôi.

Thể thực khuẩn (TKT/phage) hiện diện phổ biến trong tự nhiên có thể ly giải vi khuẩn hiệu quả. Do đó, liệu pháp thực khuẩn thể (phage therapy) đang dần trở thành một chiến lược sinh học thay thế không ảnh hưởng xấu đến môi trường để kiểm soát các bệnh do vi khuẩn (Housby & Mann, 2009). Do không có dư lượng thuốc hoặc độc tính của thuốc liên quan đến liệu pháp này, TKT đã được đề xuất như là một giải pháp thay thế cho việc sử dụng thuốc kháng sinh để kiểm soát sinh học mầm bệnh trong cá và tôm nuôi (Jun & ctg., 2016; Silva & ctg., 2016). Trong thời gian qua, ngày càng có nhiều ứng dụng của TKT trong lĩnh vực thủy sản đã được công bố. Đánh giá hiệu quả bảo vệ của chủng phage PVN02 trong việc kiểm soát do *A. hydrophila* trên cá tra của Dang và cộng sự (2021) cho thấy thức ăn bổ sung phage có tỷ lệ tử vong đã giảm còn $8.33 \pm 2.9\%$ hoặc $16.67 \pm 2.9\%$ ở liều phage $\log 6.2 \pm 0.09$ hoặc $\log 4.2 \pm 0.09$ PFU/g so với đối chứng là $68.3 \pm 2.9\%$. Trong khi đó, kết quả đánh giá hiệu quả của TKT trong điều trị bệnh cho tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) của Trương và cộng sự (2021) cho thấy sau 24 giờ bổ sung TKT, mật số vi khuẩn trong nước giảm mạnh từ 4.6×10^4 CFU/mL xuống còn 6.5×10^2 CFU/mL và sau 02 ngày bổ sung TKT mật số vi khuẩn giảm còn 3.3×10^2 CFU/mL. Kết quả thu được trên mẫu tôm cũng tương tự khi có tác động của TKT, vi khuẩn trong gan tụy tôm từ 2.3×10^5 CFU/con giảm xuống 1.1×10^2 CFU/con. Bên cạnh đó, các nghiên cứu cho thấy hầu hết các TKT có thể kiểm soát hiệu quả các bệnh do vi khuẩn như *Vibrio harveyi* nhiễm trên tôm, *Streptococcus iniae* trên cá bơn, *A. hydrophila* trên cá chạch (*Misgurnus anguillicaudatus*) và nhiễm *A. salmonicida* ở cá bơn (*Solea senegalensis*) (Akmal & ctg., 2020; Matsuoka & ctg., 2007; Silva & ctg., 2016; Stalin & Srinivasan, 2017). Báo cáo của Luo và cộng sự (2019) cho thấy cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) được điều trị bằng TKT (chủng HN48) có tỷ lệ sống là $60\% \pm 3.3\%$ và thời gian tử vong trung bình (delayed mean death time) được kéo dài thêm khoảng 03 ngày so với nhóm đối chứng có tỷ lệ sống khoảng 30%. Tuy nhiên, các báo cáo về TKT có hoạt tính ly giải vi khuẩn gây bệnh trên cá điêu hồng nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long nói chung và tỉnh Vĩnh Long nói riêng chưa được nghiên cứu. Hiện tại, chưa có nghiên cứu về TKT trên cá điêu hồng được công bố ở Việt Nam. Việc phân lập và tuyển chọn TKT có nguồn gốc bản địa là rất quan trọng. Do đó, nghiên cứu: “Phân lập thực khuẩn thể có khả năng ly giải vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá điêu hồng nuôi lồng bè ở tỉnh Vĩnh Long” được thực hiện.

2. Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu mẫu phân lập vi khuẩn *A. hydrophila* và thực khuẩn thể

Trong nghiên cứu này, cá điều hồng bệnh (trọng lượng 300 - 600g) dùng để phân lập vi khuẩn *A. hydrophila* và TKT được thu từ một số bè nuôi cá điều hồng ở cù lao An Bình, huyện Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long. Các dấu hiệu của cá bệnh như cá lơ đờ, bơi lội mất phương hướng, mắt đục và lồi, trên cơ thể cá có đốm xuất huyết ở vây bụng, vây ngực và bụng trương to (Hình 1A & B). Mẫu cá bệnh được thu nhiều đợt, từ tháng 03 đến tháng 10 (khoảng thời gian cá chết nhiều trong năm), mỗi đợt thu ở nhiều bè nuôi, mỗi bè thu 02 - 03 cá bệnh. Cá bệnh dùng để lấy mẫu phân lập vi khuẩn hoặc TKT phải còn sống hoặc vừa mới chết trong thời gian khoảng 05 - 10 phút.

2.2. Phân lập và định danh vi khuẩn *A. hydrophila*

2.2.1. Phân lập vi khuẩn *A. hydrophila*

Vi khuẩn *A. hydrophila* được phân lập từ các cơ quan như não, gan, thận và tỳ tạng của cá điều hồng bệnh dựa theo Frerichs và Millar (1993). Đầu tiên, cá được khử trùng bên ngoài bằng cồn 70°. Sau đó, cá bệnh được giải phẫu bằng dao và kéo tiệt trùng. Tiếp theo, vi khuẩn được phân lập từ 04 cơ quan: não, tỳ tạng, gan và thận trên môi trường TSA (Trypticase Soy Agar, Himedia, Ấn Độ) và ủ ở 28°C với thời gian từ 24 - 36 giờ. Các khuẩn lạc đặc trưng (khuẩn lạc màu vàng, tròn và đường kính khuẩn lạc trung bình từ 02 - 03mm) được chọn và làm thuần. Sau cùng, chủng vi khuẩn thuần được lưu trữ trong dung dịch chứa glycerol 20% (v/v) ở -80°C.

2.2.2. Định danh vi khuẩn *A. hydrophila*

Vi khuẩn *A. hydrophila* thuần được kiểm tra các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, sinh lý và sinh hóa cơ bản, bao gồm: nhuộm Gram, khả năng di động, hoạt tính oxidase và catalase, phản ứng oxi hóa và lên men glucose (phản ứng O/F) (Barrow & Feltham, 1993; Buller, 2014).

Phản ứng PCR được sử dụng để định danh vi khuẩn *A. hydrophila* bằng với cặp mồi AeroFd: 5'-CCAAGGGGTCTGTGGCGACA-3' và AeroRs: 5'-TTTCACCGGTAACAGGATTG-3' (Pollard & ctg., 1990). Thành phần phản ứng PCR gồm dung dịch đệm PCR 10X, MgCl₂ 2.5mM, dNTPs 10mM, Taq DNA polymerase 2U, mồi xuôi 20pmol, mồi ngược 20pmol, DMSO 1% và DNA mẫu 40ng. Phản ứng PCR được thực hiện gồm các bước sau: tiền biến tính ở 95°C trong 04 phút. Sau đó thực hiện 30 chu kỳ gồm giai đoạn biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 60°C trong 45 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây và kéo dài sau cùng ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR (209bp) được điện di trên gel agarose 1.5%, chụp hình bằng hệ thống chụp hình gel Analytik Jena và được gửi giải trình tự ở Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Ngoài ra, bộ kit thương mại API 20E (Biomérieux, Pháp) cũng được sử dụng để định danh vi khuẩn *A. hydrophila*.

2.3. Phân lập, khảo sát phổ ký chủ và định danh thực khuẩn thể

2.3.1. Phân lập thực khuẩn thể

TKT được phân lập dựa theo phương pháp của Kropinski và cộng sự (2018). Mô cá bệnh, bao gồm gan, não, thận và tỳ tạng (50g) được tăng sinh qua đêm cùng với 100µL dung dịch vi khuẩn *A. hydrophila*. Sau đó, mẫu được đồng nhất trong 100mL môi trường LB (Luria Bertani broth, Himedia, Ấn Độ) được bổ sung CaCl₂ 10mM và ủ qua đêm ở 37°C. Dịch thô của TKT (100µL) được pha loãng liên tục trong dung dịch đệm SM (Saline Magnesium buffer, thành phần gồm: NaCl 0.1M, Tris-HCl 0.05M (pH 7.5), MgSO₄ 0.008M và gelatin 0.01%) và trộn với 100µL vi khuẩn vật chủ trong 04mL môi trường LB 0.4% agar (w/v) để phân lập TKT có hoạt

tính ly giải vi khuẩn. Hỗn hợp này sau đó được đổ lên đĩa đã chứa sẵn môi trường TSA. Cuối cùng, các đĩa thạch hai lớp được ủ qua đêm ở 37°C và quan sát sự hình thành vết tan (plaque) sau 24 giờ (Kropinski & ctg., 2018).

Các vết tan được cho vào ống Eppendorf có chứa 01mL đệm SM, lắc mạnh hoặc sử dụng máy vortex để làm vỡ vết tan và trữ lạnh ở 4°C trong 24 giờ. Tiếp theo, 10µL chloroform được cho vào dịch TKT và ly tâm ở tốc độ 6,000 vòng/phút trong 05 phút. Phần dịch trong sẽ được chuyển sang ống Eppendorf mới. Các bước phân lập được lặp lại nhiều lần khi thu được các vết tan cùng đặc điểm và kích thước. Cuối cùng, TKT được trữ trong đệm SM hoặc nước cất ở 4°C.

2.3.2. Đánh giá phổ ký chủ của thực khuẩn thể phân lập được

Phổ ký chủ của các chủng TKT phân lập được thực hiện theo Kropinski và cộng sự (2018). Môi trường TSB (1.7% agar) sau khi chuẩn bị được kê ô và đánh số, sau đó cho hỗn hợp gồm 10mL môi trường TSB (0.6% agar) và 0.1mL huyền phù vi khuẩn *A. hydrophila* ($OD_{600nm} = 0.3 - 0.5$) lên đĩa. Dịch huyền phù TKT (2µL) sau đó được cho vào ô kê tương ứng, ủ ở 37°C và kiểm tra vết tan sau 24 giờ.

2.3.3. Định danh thực khuẩn thể phân lập được

Chủng TKT có khả năng ký sinh trên nhiều chủng vi khuẩn *A. hydrophila* được định danh dựa vào đặc điểm hình thái bằng cách nhuộm âm bản với 2% uranyl acetate, sau đó quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM, transmission electron microscopy).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Microsoft Excel 2010 được sử dụng để nhập và xử lý các số liệu và đồ thị trong thí nghiệm. Phương pháp thống kê mô tả được sử dụng để tính toán các giá trị trung bình. Tỷ lệ tương đồng của chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được so sánh với các chủng trên ngân hàng GenBank bằng chương trình BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *A. hydrophila*

Nghiên cứu đã phân lập được tổng số 20 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* từ các cơ quan như não, gan, thận và tỳ tạng của 20 mẫu cá điêu hồng bệnh từ các bè nuôi ở cù lao An Bình, huyện Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long. Nhìn chung, vi khuẩn *A. hydrophila* có thể phân lập được từ hầu hết các cơ quan của cá bệnh, trong đó phân lập được 02/25 chủng (chiếm 8%) từ não, gan (10/25 chủng, chiếm 40%), thận (05/25 chủng, chiếm 20%) và tỳ tạng (03/25 chủng, chiếm 12%) của cá bệnh (Bảng 1).

Bảng 1

Các Chủng Vi Khuẩn A. Hydrophila được Phân Lập từ các Cơ Quan của Cá Điêu Hồng Bệnh

Cơ quan cá	Số chủng vi khuẩn phân lập	Tên chủng vi khuẩn
Não	2	AH1 và AH2
Gan	10	AH3, AH4, AH5, AH6, AH7, AH8, AH9, AH10, AH11, AH12
Thận	5	AH13, AH14, AH15, AH16 và AH17
Tỳ tạng	3	AH18, AH19 và AH20

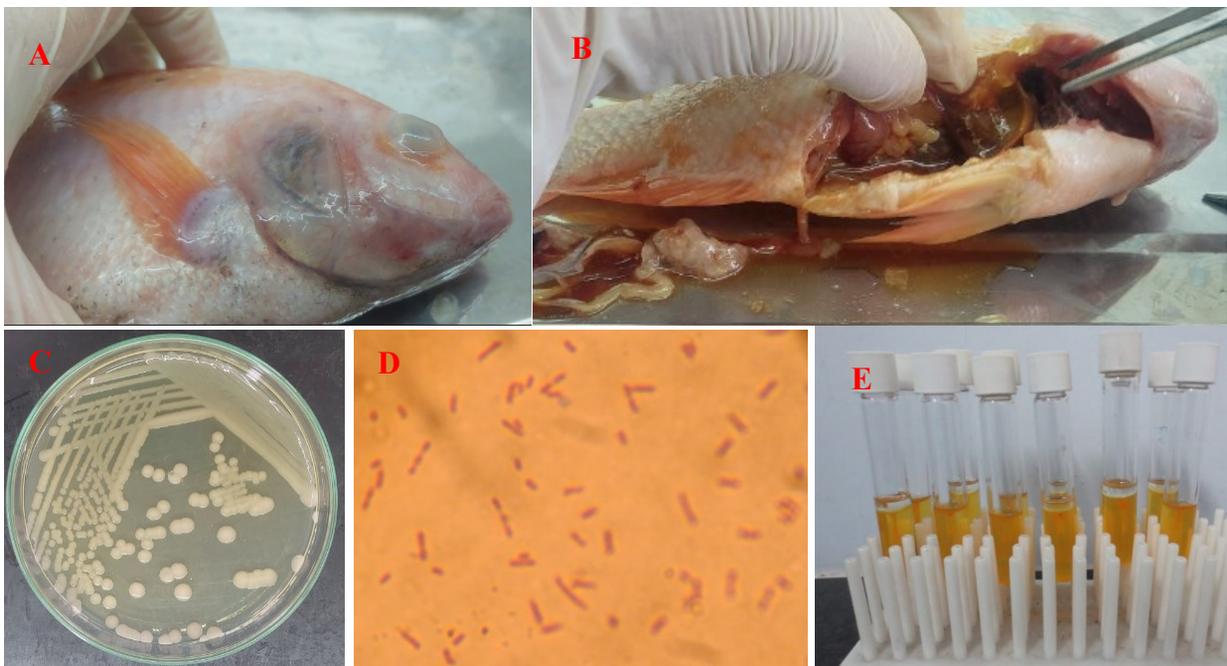
Ghi chú: Tên chủng vi khuẩn được ký hiệu AH: được lấy từ tên loài của vi khuẩn *A. hydrophila*

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Nghiên cứu cho thấy khuẩn lạc vi khuẩn phát triển trên môi trường TSA sau 24 - 36 giờ có dạng tròn (đường kính 01 - 03mm), độ nổi lồi, màu sắc từ vàng nhạt đến vàng kem (Hình 1C). Các chủng vi khuẩn phân lập thuộc nhóm Gram âm, hình que ngắn (Hình 1D) và chúng có khả năng di động. Bên cạnh đó, vi khuẩn phân lập phản ứng dương tính với oxidase và catalase, có khả năng lên men đường glucose trong cả hai điều kiện hiếu khí và yếm khí (Hình 1E). Như vậy, các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và sinh hóa cơ bản của các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá điêu hồng tương tự với các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và sinh hóa cơ bản của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trong các báo cáo trước đây (Crumlish & ctg., 2010; Dang & Nguyen, 2012; Ly & ctg., 2009).

Hình 1

Các Đặc Điểm Hình Thái và Sinh Hóa Cơ Bản của Vi Khuẩn Phân Lập được từ Cá Điêu Hồng Bệnh ở tỉnh Vĩnh Long



Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

A & B. Dấu hiệu bệnh bên ngoài và bên trong của cá điêu hồng; C. Khuẩn lạc vi khuẩn *A. hydrophila* (chủng AH3) phát triển trên môi trường TSA sau 24 giờ; D. Ảnh nhuộm Gram vi khuẩn (100X); E. Phản ứng oxi hóa và lên men đường glucose.

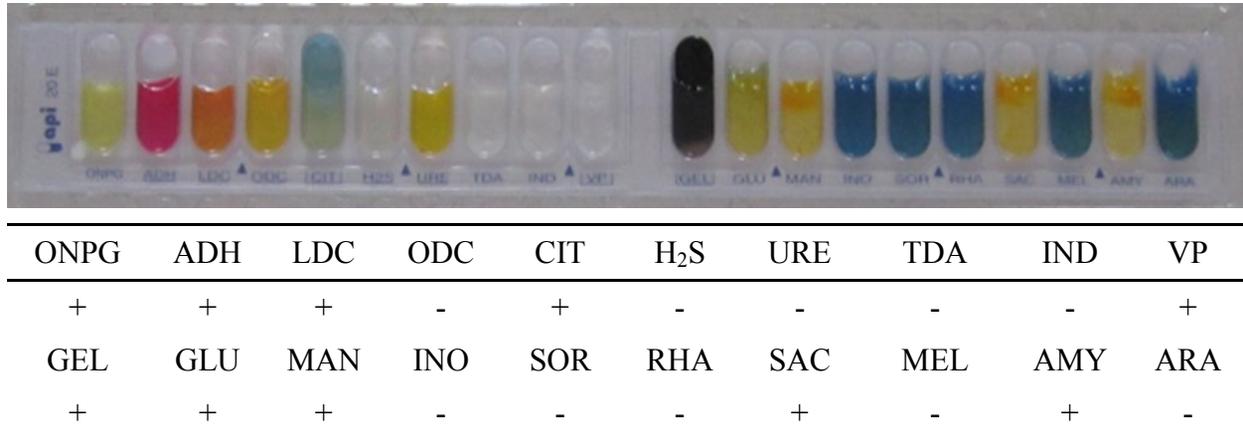
3.2. Định danh các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập bằng bộ kit API 20E

Kết quả định danh bằng bộ kit API 20E (Hình 2) cho thấy chủng vi khuẩn AH3 (chủng này được lây nhiễm trên cá điêu hồng sau khi phân lập nên được chọn định danh) phản ứng âm tính với ornithine decarboxylase (ODC), H₂S, urease, tryptophane deaminase, indole, inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose và arabinose. Trong khi đó, vi khuẩn phản ứng dương tính với orthonitrophenyl galactosidase, argininine dihydrolase (ADH), citrate (khả năng sử dụng như là nguồn carbon duy nhất), lysine decarboxylase (LDC), Voges-Proskauer, gelatinase, glucose, mannitol, saccharose và amygdalin. Như vậy, qua kiểm tra bằng bộ kit API 20E cho thấy chủng AH3 (tương đồng 99% với loài *A. hydrophila*) có các đặc điểm sinh hóa tương tự với vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cá tra bệnh xuất huyết đã được báo cáo (Crumlish & ctg., 2010; Dang & ctg., 2014; Ly & ctg., 2009). Tuy nhiên, các đặc điểm của chủng vi khuẩn phân lập có một số

đặc điểm khác với vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh MAS (Motile *Aeromonas* Septicemia) trên cá nheo Mỹ của Pridgeon và Klesius (2011) như citrate, indole, inositol, saccharose, arabinose, lysine decarboxylase và amygdalin. Kết quả này có thể do vi khuẩn được phân lập từ các môi trường sống và loài cá khác nhau.

Hình 2

Chủng Vi Khuẩn AH3 Phân Lập được Định Danh bằng Bộ Kit API 20E



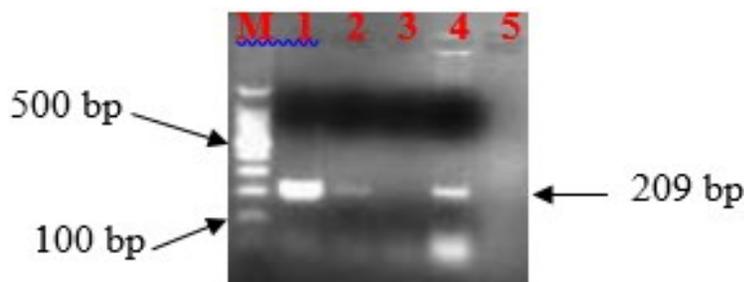
Ghi chú: +: phản ứng dương tính; -: phản ứng âm tính
 Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.3. Định danh vi khuẩn *A. hydrophila* bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự

Các chủng vi khuẩn đại diện được kiểm tra bằng phản ứng PCR đều khuếch đại gene mã hoá cho độc tố aerolysin đặc hiệu của vi khuẩn *A. hydrophila* với sản phẩm khuếch đại xuất hiện ở kích thước 209bp (Hình 3). Kết quả này tương tự với các báo cáo trước đây cho thấy gene mã hoá cho độc tố aerolysin được sử dụng để định danh vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên các loài cá hoặc trong môi trường nước (Le & ctg., 2010; Umesha & ctg., 2011). Sử dụng kỹ thuật mPCR, Panangala và cộng sự (2007) đã phát hiện cùng lúc 03 loài vi khuẩn *A. hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Flavobacterium columnare* trên cá nheo Mỹ. Ở Việt Nam, Nguyen và cộng sự (2010) cũng đã chẩn đoán thành công vi khuẩn *A. hydrophila* từ thận cá tra bệnh xuất huyết bằng kỹ thuật PCR. Ngoài ra, việc giải trình tự gene aerolysin của chủng AH3 cho thấy chủng này tương đồng 100% với vi khuẩn *A. hydrophila* (FJ608555.1) trên ngân hàng Gene (Hình 4).

Hình 3

Gene Mã Hoá Độc Tố Aerolysin Đặc Hiệu của các Chủng Vi Khuẩn Phân Lập được Khuếch Đại bằng Kỹ Thuật PCR



Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

M: thang chuẩn 100bp; giếng 1, 2 và 4: thứ tự các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* đại diện được kiểm tra là AH1, AH3 và AH13; giếng 3: mẫu cho kết quả âm tính; giếng 5: đối chứng nước.

Hình 4

Kết Quả So Sánh Độ Tương Đồng Trình Tự Đoạn Gene Aerolysin của Chủng Vi Khuẩn AH3 Trên Ngân Hàng Gene

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain ZC1 aerolysin (aerA) gene, partial cds	Aeromonas hydrophila	244	244	38%	1e-59	100.00%	150	FJ608555.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain wp3 aerolysin (aerA) gene, partial cds	Aeromonas hydrophila	239	239	38%	5e-58	99.24%	151	FJ608554.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain LHW39 chromosome, complete genome	Aeromonas hydrophila	237	237	41%	2e-57	97.18%	5099855	CP050012.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain ZYAH72 chromosome, complete genome	Aeromonas hydrophila	237	237	41%	2e-57	97.18%	5159182	CP016989.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain GYK1 chromosome, complete genome	Aeromonas hydrophila	237	237	41%	2e-57	97.18%	4951765	CP016392.1

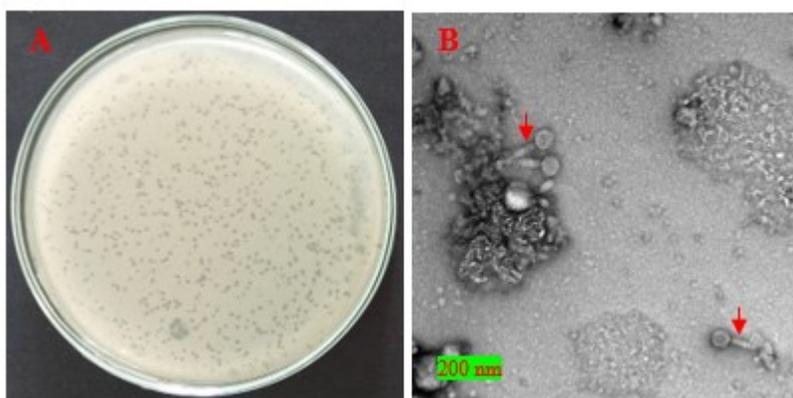
Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.4. Kết quả phân lập phage *A. hydrophila*

Nghiên cứu sử dụng chủng AH3 để phân lập phage *A. hydrophila* do chủng này đã được lây nhiễm trên cá điêu hồng sau khi phân lập. Kết quả đã phân lập được 10 chủng TKT (được ký hiệu là Φ A1, Φ A2, Φ A3, Φ A4, Φ A5, Φ A6, Φ A7, Φ A8, Φ A9, và Φ A10) từ 60 mẫu cá điêu hồng. Nhìn chung, các dòng TKT đều được phân lập trên các cơ quan của cá điêu hồng, trong đó cơ quan phân lập được nhiều dòng TKT nhất là gan (05/10 chủng, chiếm 50%), thận (03/10 chủng, chiếm 30%) và tỳ tạng (02/10 chủng, chiếm 20%). Trong khi đó, nghiên cứu không phân lập được dòng TKT nào từ não của cá bệnh. Kết quả này có thể do số lượng mẫu não của cá điêu hồng bệnh dùng để phân lập TKT trong thí nghiệm còn ít. Ngoài ra, vi khuẩn *A. hydrophila* thường hiện diện chủ yếu trên các cơ quan cá bệnh như gan, thận và tỳ tạng, trong khi não không có nhiều vi khuẩn này cũng có thể là nguyên nhân không phân lập được TKT. Kết quả quan sát cho thấy hầu hết vết tan (plaque) của các chủng TKT phân lập có dạng tròn, tâm trong và đường kính vết tan dao động từ 02 - 05mm (Hình 5). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hoang và cộng sự (2019) cho thấy các TKT ly giải vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ nước ao nuôi cá tra có đường kính vết tan dao động từ 02 - 03mm. Sự khác nhau về hình thái vết tan của các dòng TKT có thể là do sự khác nhau về cách thức xâm nhiễm và tốc độ sinh trưởng của TKT. Kích thước của vết tan thể hiện khả năng phân giải vi khuẩn mạnh hay yếu của TKT nếu cùng ký chủ vi khuẩn. Do đó, dựa vào kích thước của vết tan có thể tuyển chọn được những TKT tiềm năng, có khả năng phân giải vi khuẩn mạnh.

Hình 5

Thực Khuẩn Thể được Phân Lập từ Gan của Cá Điêu Hồng Bệnh



Ghi chú: A. Vết tan có dạng đốm tròn, tâm trong, viền ngoài mờ, đường kính vết tan 02 - 05mm; B. Ảnh chụp TEM của TKT Φ A3 với thang tỷ lệ 200nm

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.5. Kết quả đánh giá phổ ký chủ của thực khuẩn thể

Phổ ký chủ của các chủng TKT được trình bày chi tiết ở Bảng 2. Kết quả từ Bảng 2 cho thấy hầu hết các chủng TKT phân lập đều có hoạt tính ly giải từ 02 - 09 chủng vi khuẩn phân lập, trong đó chủng TKT ΦA3 có phổ ký chủ nhiều nhất (09/20 chủng vi khuẩn), kế đến là các chủng ΦA2 (08/20 chủng vi khuẩn), ΦA1 và ΦA7 (07/20 chủng vi khuẩn) và chủng ΦA9 có phổ ký chủ ít nhất (02/20 chủng vi khuẩn). Nhiều báo cáo trước đây cho thấy TKT có khả năng ký sinh rộng trên nhiều chủng vi khuẩn *Aeromonas* (Kumari & ctg., 2023; Liu & ctg., 2020). Báo cáo của Le và cộng sự (2018) cho thấy các TKT được phân lập từ các mẫu nước ở sông Sài Gòn có thể ly giải vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh MAS trên cá tra ở Việt Nam. Đặc biệt, các chủng TKT trong nghiên cứu này cũng được phát hiện là có phổ hoạt động rộng, thậm chí chống lại các chủng *Aeromonas* đa kháng kháng sinh đã được thử nghiệm. Các TKT có phạm vi vật chủ rộng được coi là hữu ích hơn trong một số ứng dụng. Như vậy, với khả năng ký chủ trên nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh, các chủng TKT ΦA1, ΦA2, ΦA3, và ΦA7 có tiềm năng trong việc tạo chế phẩm nhằm kiểm soát các mầm bệnh vi khuẩn trong lĩnh vực thủy sản. Hiện nay, nhiều dòng TKT được trộn thành cocktail để có thể tiêu diệt nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh (Hoang, 2018; Hoang & ctg., 2019).

Bảng 2

Khả Năng Ký Sinh của các Chủng Thực Khuẩn Thể Phân Lập đối với Vi Khuẩn *A. hydrophila*

Chủng vi khuẩn	ΦA1	ΦA2	ΦA3	ΦA4	ΦA5	ΦA6	ΦA7	ΦA8	ΦA9	ΦA10	Tổng
AH1	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	5
AH2	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	4
AH3	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	6
AH4	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	5
AH5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2
AH6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	4
AH7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	2
AH8	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	2
AH9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	2
AH10	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	2
AH11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
AH12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
AH13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AH14	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3
AH15	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	3
AH16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AH17	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	3
AH18	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	4
AH19	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	2
AH20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Tổng	7	8	9	5	5	3	7	4	2	3	53

Ghi chú: - : TKT không ly giải vi khuẩn; +: TKT ly giải vi khuẩn

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.6. Kết quả định danh thực khuẩn thể

Dòng TKT ΦA3 có phổ ký chủ rộng nhất được chọn để định danh dựa vào hình thái bằng chụp ảnh TEM. Nghiên cứu cho thấy TKT ΦA3 có cấu trúc đầu và đuôi rõ ràng (Hình 4B). Do đó, nghiên cứu có thể kết luận chủng TKT ΦA3 thuộc bộ *Caudovirales*. Theo Ackermann (2007), bộ *Caudovirales* hiện được phân loại lại là bộ *Caudoviricetes* (Turner & ctg., 2022) chiếm 96% tổng số TKT và là thực thể sinh học (biological entity) phổ biến trên trái đất. Bên cạnh đó, dựa vào Hình 4B cho thấy TKT ΦA3 có đuôi dài và bao đuôi (mũi tên). Tóm lại, dựa vào các đặc điểm hình thái thu thập, TKT ly giải vi khuẩn *A. hydrophila* trong nghiên cứu thuộc họ *Peduviridae* (trước đây là họ *Myoviridae*). Như vậy, kết quả này phù hợp với báo cáo của Ackermann (2007) cho thấy 33 trong tổng số 43 TKT *Aeromonas* là có đuôi và thuộc họ *Myoviridae*. Gần đây, nhiều nghiên cứu về TKT cũng cho thấy các phage *Aeromonas* được xác định thuộc họ *Myoviridae* (Liu & ctg., 2020; Rai & ctg., 2020). Nghiên cứu của Chandrarathna và cộng sự (2020) cho thấy TKT AHP-1 có khả năng ly giải vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh MAS trên cá ở Hàn Quốc được xác định thuộc họ *Myoviridae*. Theo Batinovic và cộng sự (2019), các thành viên bộ *Caudovirales*, bao gồm họ *Myoviridae* hiện diện phổ biến trong tự nhiên.

4. Kết luận và kiến nghị

4.1. Kết luận

Vi khuẩn *A. hydrophila* được phân lập và xác định từ não, gan, thận và tỳ tạng của cá điều hồng dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh hóa và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA. Nghiên cứu đã phân lập được các chủng TKT từ gan, thận và tỳ tạng của cá điều hồng có hoạt tính ly giải vi khuẩn *A. hydrophila* nhiễm trên cá điều hồng nuôi lồng bè ở tỉnh Vĩnh Long. Hầu hết các chủng TKT đều có khả năng ký sinh trên nhiều chủng vi khuẩn được phân lập. Chủng TKT ΦA3 có phổ ký chủ nhiều nhất được xác định thuộc họ *Myoviridae* dựa vào đặc điểm hình thái quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng TKT ΦA3 trong việc kiểm soát vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá điều hồng.

4.2. Kiến nghị

Cần giải trình tự gene để định danh chính xác dòng TKT ΦA3 trong nghiên cứu. Ngoài ra, cần tiếp tục khảo sát về các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến TKT và nghiên cứu các đặc tính sinh hóa khác nhau của chủng TKT ΦA3 để cung cấp dữ liệu khoa học cho việc sản xuất các chế phẩm TKT kiểm soát vi khuẩn.

Tài liệu tham khảo

- Ackermann, H. W. (2007). 5500 phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152, 227-243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Akmal, M., Rahimi-Midani, A., Hafeez-Ur-Rehman, M., Hussain A., & Choi, T. J. (2020). Isolation, characterization, and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pathogens*, 9(3), 215-228. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030215>
- Barrow, G. I., & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria* (3rd ed.). Cambridge University Press.
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., Chan, H. T., Seviour, R. J., Petrovski, S., & Franks, A. E. (2019). Bacteriophages in natural and artificial environments. *Pathogens*, 8(3), 100-119. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>

- Buller, N. B. (2014). *Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: A practical identification manual* (2nd ed.). CABI.
- Cao, Y., Zhang, Y., Lan, W., & Sun, X. (2021). Characterization of vB_VpaP_MGD2, a newly isolated bacteriophage with biocontrol potential against multidrug-resistant *Vibrio parahaemolyticus*. *Archives of Virology*, 166(2), 413-426. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04887-x>
- Chandrarathna, H. P. S. U., Nikapitiya, C., Dananjaya, S. H. S., De Silva, B. C. J., Heo, G. J., Zoysa, M. D., & Lee, J. (2020). Isolation and characterization of phage AHP-1 and its combined effect with chloramphenicol to control *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Microbiology*, 51, 409-416. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00178-z>
- Crumlish, M., Thanh, P. C., Koesling, J., Vo, T. T., & Gravingen, K. (2010). Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 33(9), 717-722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01173.x>
- Dang, O. T. H., & Nguyen, P. T. (2012). Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* bacteria from red tilapia (*Oreochromis* sp.) with eye edema and hemorrhage. *CTU Journal of Science*, 22c, 203-212.
- Dang, O. T. H., Tran, X. T. T., Le, D. T. M., Le, P. N., & Hoang, A. H. (2021). Protective efficacy of phage PVN02 against haemorrhagic septicaemia in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* via oral administration. *Journal of Fish Diseases*, 44(8), 1-9. <https://doi.org/10.1111/jfd.13387>
- Dang, T. T. M., Tu, D. T., & Pham, P. T. K. (2014). Histopathological characterisations of Clown knifefish (*Chitala chitala*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *CTU Journal of Science*, 2, 29-36.
- Frerichs, N. G., & Millar, S. D. (1993). *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. UK of Pisces Press.
- Hoang, A. H., Tran, X. T. T., Le, N. P., & Dang, O. T. H. (2019). Selection of phages to control *Aeromonas hydrophila* - An infectious agent in striped catfish. *Biocontrol Science*, 24(1), 23-28. <https://doi.org/10.4265/bio.24.23>
- Hoang, D. M., Hoang, S. M., Honjoh, K., & Miyamoto, T. (2018). Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *Learning with Technologies*, 91(8), 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.072>
- Housby, J. N., & Mann N. H. (2009). Phage therapy. *Drug Discovery*, 14, 536-540. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.03.006>
- Jun, J. W., Han, J. E., Tang, K. F., Lightner, D. V., Kim, J., Seo, S. W., & Park, S. C. (2016). Potential application of bacteriophage pVp-1: Agent combating *Vibrio parahaemolyticus* strains associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp. *Aquaculture*, 457(4), 100-103. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.018>
- Khair, M. H. M. M., Tee, A. N., Wahab, N. F., Othman, S. S., Goh, Y. M., Masarudin, M. J., Chong, C. M., In, L. L. A., Gan, H. M., & Song, A. A. L. (2023). Comprehensive characterization of a *Streptococcus agalactiae* phage isolated from a tilapia farm in Selangor, Malaysia, and its potential for phage therapy. *Pharmaceuticals*, 16(5), 698-723. <https://doi.org/10.3390/ph16050698>

- Kropinski, A. M., Clokie, M. R. J., & Lavigne, R. (2018). Bacteriophages: Methods and protocols. *Advanced Techniques*, 3, Article 1681. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9>
- Kumari, R., Yadav, R., Kumar, D., Chaube, R., & Nath, G. (2023). Evaluation of bacteriophage therapy of *Aeromonas hydrophila* infection in a freshwater fish, *Pangasius bichanani*. *Frontiers in Aquaculture*, 2, 1-12. <https://doi.org/10.3389/faqc.2023.1201466>
- Le, S. T., Nguyen, H. T., Vo, P. H., Doan, C. V., Nguyen, L. H., Tran, T. M., Tran, T. T., Paul, C. S., & Kurtböke D. I. (2018). Southgate PC, Kurtböke DÍ. Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* species causing Motile Aeromonas Septicemia (MAS) in striped catfish. *Antibiotics (Basel)*, 7(1), 16-27. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010016>
- Le, T. H., Truong, N. Q., Nguyen, G. H., & Dang, O. T. H. (2010). Research on the application of PCR process to simultaneously diagnose *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila* bacteria on Pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*). *CTU Journal of Science*, 16a, 129-135.
- Liu, J., Gao, S., Dong, Y., Lu, C., & Liu, Y. (2020). Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*. *BMC Microbiology*, 20, 141-154. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01811-w>
- Luo, X., Liao, G., Liu, C., Jiang, X., Lin, M., Zhao, C., Tao J., & Huang, Z. (2019). Characterization of bacteriophage HN48 and its protective effects in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus agalactiae* infections. *Journal of Fish Diseases*, 41(10), 1477-1484. <https://doi.org/10.1111/jfd.12838>
- Ly, L. T. T., Nguyen, D. N., Vo, P. H., & Doan, C. V. (2009). Hemorrhage disease of cultured tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Mekong Delta (Vietnam). *The Israeli Journal of Aquaculture*, 61(3), 215-224. <https://doi.org/10.46989/001c.20557>
- Matsuoka, S., Hashizume, T., Kanzaki, H., Lwamoto, E., Chang, P. S., Hashizume, T., & Kanzaki, H. (2007). Phage therapy against b-hemolytic streptococcosis of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology*, 42(4), 181-189. <https://doi.org/10.3147/jsfp.42.181>
- Nguyen, G. H., Le, T. H., Truong, N. Q., & Dang, O. T. H. (2010). Research on the application of PCR process to diagnose *Aeromonas hydrophila* bacteria on catfish kidney (*Pangasianodon hypophthalmus*). *CTU Journal of Science*, 16a, 136-140.
- Panangala, V. S., Shoemaker, C. A., Van Santen, V. L., Dybvig, K., & Klesius, P. H. (2007). Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74(3), 199-208. <https://doi.org/10.3354/dao074199>
- Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D., & Rozee, K. R. (1990). Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(11), 2477-2481. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.11.2477-2481.1990>
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2011). Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94(3), 249-253. <https://doi.org/10.3354/dao02332>

- Rai, S., Tyagi, A., Kalia, A., Kumar, B. T. N., Garg, P., & Singh, N. K. (2020). Characterization and genome sequencing of three *Aeromonas hydrophila*-specific phages, CF8, PS1, and PS2. *Archives of Virology*, 165(7), 1675-1678. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04644-0>
- Shende, R. K., Hirpurkar, S. D., Sannat, C., Rawat, N., & Pandey, V. (2017). Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. *Veterinary World*, 10(8), 973-978. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.973-978>
- Siddiqui, A. Q., & Al-Harbi, A. H. (1995). Evaluation of three species of tilapia, red tilapia and a hybrid tilapia as culture species in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 138(1/4), 145-157. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01088-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01088-2)
- Silva, Y. J., Moreirinha, C., Pereira, C., Costa, L., Rocha, R. J., Cunha, A., Gomes, N. C. M., Calado, R., & Almeida, A. (2016). Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with phage AS-A. *Aquaculture*, 450(2015), 225-233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.025>
- Stalin, N., & Srinivasan, P. (2017). Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Vet Microbiol*, 207, 83-96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.006>
- Tran, P. M., Nguyen, E. T., Phung, H. T. T., Nguyen, N. K., Nguyen, T. Q., Do, H. T. T., & Nguyen, P. T. (2017). The use of drug, chemical, and probiotic in red tilapia (*Oreochromis* sp.) cage culture in Mekong Delta, Vietnam. *CTU Journal of Science*, 51b, 80-87.
- Truong, V. T. B., Tran, N. V. B., Nguyen, L. T. C., Le, N. H. B., Phan, K. T. H., & Pham, A. H. (2021). Effective application of bacteriophages in the treatment of diseases caused by *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Agriculture & Rural Development*, 9(2), 163-169.
- Turner, D., Shkorporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., van Zyl, L. J., Aziz, R. K., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., Kropinski, A. M., Barylski, J., Brister, J. R., Chanisvili, N., Edwards, R. A., Enault, F., Gillis, A., Knezevic, P., Krupovic, M., Kurtböke, I., Kushkina, A., Lavigne, R., Lehman, S., Lobočka, M., Moraru, C., Moreno Switt, A., Morozova, V., Nakavuma, J., Reyes Muñoz, A., Rümnieks, J., Sarkar, B. L., Sullivan, M. B., Uchiyama, J., Wittmann, J., Yigang, T., & Adriaenssens, E. M. (2022). Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2), 74-83. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05694-2>
- Umesha, D., Srinivasa, R. P., Prasad, K. P., Reddy, A. K., & Srinivas, K. N. (2011). Aerolysin and hemolysin virulence genes of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased ornamental freshwater oscarfish and goldfish by polymerase chain reaction. *International Journal of Advances in Science and Technology*, 3, 84-86.
- Zonneveld, N., & Fadholi, R. (1991). Feed intake and growth of red tilapia at different stocking densities in ponds in Indonesia. *Aquaculture*, 99(1/2), 83-94. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90289-J](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90289-J)

