

Nghiên cứu phân lập và xác định một số đặc tính của thể thực khuẩn kháng *Vibrio alginolyticus*

Trương Quốc Phong^{1,2*}, Vi Thị Thu Thảo², Nguyễn Thanh Hoà^{1,2}, Ngô Thu Hương³

¹Viện Khoa học và Công nghệ Sức khoẻ, Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Hoá và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam

³Trung tâm Nghiên cứu sản xuất vắc xin và sinh phẩm y tế, 135 Lò Đúc, phường Phạm Đình Hồ, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/10/2024; ngày chuyển phân biên 9/10/2024; ngày nhận phân biên 25/10/2024; ngày chấp nhận đăng 30/10/2024

Tóm tắt:

Thể thực khuẩn là một loại virus nhận biết và xâm nhiễm đặc hiệu vi khuẩn. Trong quá trình phát triển thể thực khuẩn sẽ phá huỷ tế bào chủ nên là đối tượng hấp dẫn đối với các nhà nghiên cứu trong việc phát triển giải pháp sinh học tiêu diệt đặc hiệu vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, hai nội dung chính được thực hiện là phân lập vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* và thể thực khuẩn đặc hiệu. Chủng *V. alginolyticus* M1 được phân lập từ nước đầm nuôi tôm, đồng thời một số đặc tính hình thái, sinh hoá đã được xác định. Chủng này được định danh thông qua trình tự 16S rDNA. Sử dụng chủng chủ là *V. alginolyticus* M1, bốn dòng thể thực khuẩn có hoạt tính ly giải tế bào chủ đã được phân lập từ nước bể nuôi tôm và nước thải tại chợ hải sản. Tính đặc hiệu vật chủ của các dòng thể thực khuẩn lựa chọn đã được kiểm tra và cho thấy cả bốn dòng không ly giải các chủng *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, các chủng probiotics như *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*. Trong đó, thể thực khuẩn NT1 có hoạt tính ly giải mạnh nhất, độ bền nhiệt lên đến 60°C, pH 3-10, là ứng cử viên tốt để phát triển giải pháp kiểm soát sinh học đối với bệnh do *V. alginolyticus* gây ra.

Từ khoá: phân lập, thể thực khuẩn, *Vibrio alginolyticus*.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Vibrio alginolyticus*

Quoc Phong Truong^{1,2*}, Thi Thu Thao Vi², Thanh Hoa Nguyen^{1,2}, Thu Huong Ngo³

¹Institute of Health Science and Technology, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Street, Bach Mai Ward, Hanoi, Vietnam

²School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Street, Bach Mai Ward, Hanoi, Vietnam

³Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals, 135 Lo Duc Street, Pham Dinh Ho Ward, Hanoi, Vietnam

Received 7 October 2024; revised 25 October 2024; accepted 30 October 2024

Abstract:

Bacteriophage is a virus that specifically recognises and infects bacteria. During the life cycle, bacteriophage destroys the host cell, so it is an attractive agent for researchers in developing biological solutions to specifically kill bacteria. In this study, two main objectives were addressed: isolating *Vibrio alginolyticus* bacteria and specific bacteriophages. The *V. alginolyticus* M1 strain was isolated from shrimp pond water, and some morphological and biochemical characteristics were determined. This strain was identified by 16S rDNA sequencing. Using the host strain *V. alginolyticus* M1, four bacteriophage strains showing strong host cell lytic activity were isolated from shrimp tank water and seafood market wastewater. The host specificity of the selected phage isolates was tested, showing that none of the four phage isolates lysed *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 strains, and probiotic strains such as *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Among the four selected strains, bacteriophage NT1 exhibited the strongest lytic activity, thermal stability up to 60°C across a pH range of 3-10, and is a promising candidate for developing biological control solutions against diseases caused by *V. alginolyticus*.

Keywords: bacteriophage, isolation, *Vibrio alginolyticus*.

Classification numbers: 1.6, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Vibrio alginolyticus là loài vi khuẩn gram âm kỵ khí tùy tiện, ưa mặn. Loài vi khuẩn này được cho là nguyên nhân gây bệnh phân trắng ở tôm, đây là một trong những bệnh nguy hiểm, phổ biến và gây thiệt hại kinh tế lớn cho ngành nuôi tôm công nghiệp. Vì là tác nhân vi khuẩn gây bệnh cho tôm nên giải pháp phòng và trị bệnh bằng kháng sinh đã được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh rộng rãi, thời gian dài đã để lại những hậu quả lớn như tạo ra các quần thể vi khuẩn kháng kháng sinh, dẫn đến nguy cơ lan truyền gen kháng kháng sinh cho các loài vi khuẩn khác [1]. Việc sử dụng kháng sinh cũng có thể để lại tồn dư kháng sinh trong tôm thương phẩm, dẫn đến làm giảm chất lượng của tôm và thậm chí không thể xuất khẩu được vào các thị trường có kiểm soát nghiêm ngặt dư lượng này. Do vậy, giải pháp sinh học an toàn để phòng và trị bệnh do *Vibrio* gây ra luôn được quan tâm và ưu tiên nghiên cứu phát triển.

Thể thực khuẩn là một loại virus có khả năng xâm nhiễm và giết các tế bào vi khuẩn chủ. Trong tự nhiên, thể thực khuẩn rất đa dạng và có thể tồn tại trong nhiều môi trường khác nhau. Thể thực khuẩn có độ bền tốt trong điều kiện nhiệt độ cao đến 60°C và phổ pH rộng (pH 4-10) [2-7]. Thể thực khuẩn chỉ xâm nhiễm các tế bào chủ là vi khuẩn mà hoàn toàn không xâm nhiễm vào các tế bào nhân thực do đó đây được coi là một tác nhân sinh học an toàn cho người, vật nuôi và môi trường. Do đó, sử dụng thể thực khuẩn có thể được xem là một liệu pháp tiêu diệt vi khuẩn an toàn thay thế kháng sinh. Thể thực khuẩn có tốc độ sinh trưởng rất nhanh. Tải lượng thể thực khuẩn có thể đạt cực đại trong vòng 60-120 phút kể từ khi xâm nhiễm [2-7]. Đặc điểm này rất phù hợp để có thể sản xuất lượng lớn thể thực khuẩn phục vụ cho phát triển sản phẩm ứng dụng. Do có nhiều ưu điểm nên thể thực khuẩn đã được sử dụng để tạo một số sản phẩm ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau như nông nghiệp, chăn nuôi [8], môi trường [9], thực phẩm [10-12], và y tế [13, 14].

Một số sản phẩm chứa thể thực khuẩn đã được thương mại hoá và được phép lưu hành trên các thị trường Mỹ, châu Âu, Anh, Canada. Sản phẩm Biolysse® BP và AgriPhage™ được sử dụng cho thực vật; các sản phẩm như Ecolicide®, Finalyse®, BAFACOL™, SalmoLyse®... được sử dụng để trị bệnh nhiễm khuẩn ở động vật; các sản phẩm như PhageGuard E™, ShigActive™... được sử dụng để phòng và điều trị nhiễm khuẩn cho người [15]. Điều này chứng minh rằng việc tìm kiếm các thể thực khuẩn có tính đặc hiệu cao với vi khuẩn gây bệnh để phát triển thành sản phẩm ứng dụng là cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn.

Trong nghiên cứu này, vi khuẩn chủ *V. alginolyticus* đã được phân lập và xác định từ nước đầm nuôi tôm ở Hải Phòng. Thể thực khuẩn đặc hiệu *V. alginolyticus* đã được phân lập từ nước đầm nuôi tôm và nước thải của chợ hải sản ở Hà Nội. Thể thực khuẩn thu được có một số đặc tính tốt để trở thành ứng viên cho phát triển sản phẩm ứng dụng phục vụ phòng và trị bệnh do *V. alginolyticus* gây ra cho thủy sản.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Mẫu và chủng giống

Mẫu nước dùng để phân lập *V. alginolyticus* là mẫu nước đầm tôm lấy tại khu vực đê biển Hải Thành, phường Tân Thành, quận Dương Kinh, Hải Phòng (trước sáp nhập). Mẫu nước dùng để phân lập thể thực khuẩn là các mẫu nước lấy từ bể chứa tôm và nước thải khu bán hải sản sống tại chợ Long Biên, Hà Nội.

Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn thực phẩm. Các chủng *V. parahaemolyticus* BL, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Hoá và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội.

2.1.2. Hoá chất và môi trường

Các hoá chất bao gồm peptone, cao nấm men, NaCl, chất chỉ thị (neutral red, phenol red), agar, CaCl₂, glucose, lactose... được mua từ các Hãng Merck, Himedia. Các hoá chất dùng cho sinh học phân tử như Tris-HCl, CH₃COONa, chloroform, isoamylalcohol, agarose, EDTA... được mua từ các hãng Sigma, Merck. PrimeSTAR HS DNA Polymerase PCR kit được mua từ Takara Bio (Trung Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập *Vibrio alginolyticus* và xác định đặc tính

Phân lập *V. alginolyticus*: Mẫu nước được pha loãng liên tiếp đến 10⁻⁴, 10⁻⁵ và 10⁻⁶ bằng dung dịch 0,9% NaCl vô trùng. Sau đó, 0,1 ml dịch pha loãng được cấy trải lên đĩa thạch chứa peptone 15 g/l, cao nấm men 5 g/l, lactose 4 g/l, NaCl 30 g/l, đỏ trung tính 0,01 g/l, agar 2 g/l, pH 8,8. Đĩa thạch được ủ ở 37°C trong 16-18 giờ. Các khuẩn lạc đơn màu vàng, hình tròn, nhẵn sẽ được lựa chọn để tiếp tục làm sạch bằng cách cấy ria lên đĩa thạch mới. Các khuẩn lạc đơn tiếp tục được lựa chọn và cấy trải lên môi trường TCBS (0,5% cao nấm men, 1% peptone, 1% Na₂S₂O₃, 1% C₆H₅Na₃O₇, 0,5% muối mật, 2% sucrose, 1% NaCl, 0,1% C₆H₅FeO₇, Bromophenol blue, Thymol blue, 1,4% thạch). Sau khi ủ ở 37°C trong 18 giờ, hình thái các khuẩn lạc được quan sát, các tế bào từ khuẩn lạc được nhuộm Gram và quan sát trên kính hiển vi quang học với tổng độ phóng đại 1000X.

Đánh giá khả năng lên men glucose và lactose: Môi trường lỏng chứa peptone 10 (g/l), NaCl 30 (g/l), glucose/lactose 10 (g/l), phenol red 1,8 mg, pH 7.4 và có ống Durham được sử dụng để đánh giá khả năng lên men đường glucose và lactose. Khuẩn lạc được lựa chọn được cấy vào ống môi trường lỏng sau đó nuôi ở 37 °C trong 16-18 giờ. Khả năng lên men của vi khuẩn đối với các loại đường được đánh giá dựa vào sự đổi màu của môi trường từ đỏ sang vàng. Khả năng sinh khí của chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua ống Durham.

Xác định khả năng sinh catalase: Để xác định xem vi khuẩn có khả năng sinh catalase hay không, phương pháp phết lam kính được sử dụng. Sinh khối vi khuẩn được phết lên lam kính, sau đó nhỏ 1 giọt 3% H₂O₂ phủ lên sinh khối. Quan sát sự hình thành bọt khí trên giọt dung dịch H₂O₂.

Phương pháp PCR và giải trình tự gen 16S rDNA: Tách chiết DNA tổng số: Sinh khối vi khuẩn sau khi thu nhận từ 1 ml canh trường được hoà trong 0,5 ml đệm phá tế bào (Tris-HCl 400 mM, EDTA 60 mM, NaCl 150 mM, 1% SDS, lysozyme, pH 8,0), ủ 37°C trong 30 phút; sau đó bổ sung 0,2 ml CH₃COONa 5M và trộn đều; hỗn dịch được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu nhận phần dịch nổi; bổ sung một lượng tương đương về thể tích hỗn hợp chloroform : isoamylalcohol (24:1), trộn đều, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút; thu nhận pha trên và trộn với isopropanol theo tỷ lệ 1:1 về thể tích, ủ phản ứng 30 phút trên đá; kết tủa DNA được thu nhận bằng ly tâm 12.000 vòng/phút trong 20 phút và rửa với 70% ethanol; cặn tủa DNA được làm khô và hoà tan trở lại bằng DIH₂O. Độ sạch và hàm lượng DNA được kiểm tra bằng phương pháp quang phổ.

Phản ứng PCR khuếch đại gen 16S rDNA: Được thực hiện sử dụng cặp môi phổ biến là 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) và 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT). Hỗn hợp phản ứng PCR được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm PCR PrimeSTAR HS DNA Polymerase, Takara Bio. Chu trình nhiệt gồm 35 chu kỳ: 98°C-8 giây, 55°C-5 giây, 72°C-90 giây.

Giải trình tự gen 16S rDNA và định loài: Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng PureLink PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Trình tự DNA được xác định bằng phương pháp Sanger bởi hãng 1st BASE (Singapore). Trình tự nucleotide của đoạn gen đích 16S rDNA được phân tích bằng phần mềm Bioedit 7.2 và nhận diện bằng công cụ BLAST trên ngân hàng NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.2. Phân lập và sàng lọc thể thực khuẩn

Làm giàu thể thực khuẩn: Lấy 30 ml mẫu nước phân tích vào ống falcon 50 ml ly tâm ở tốc độ 8000 x g trong 10 phút. Dịch nổi ly tâm được chuyển sang ống falcon mới và được ly tâm lần thứ hai. Sau đó, 5 ml dịch nổi ly tâm được thu vào bình tam giác đã tiệt trùng, thêm 5 ml môi trường lỏng 2X MLB (peptone 20 g/l, cao nấm men 10 g/l, NaCl 60 g/l) và 1 ml canh trường *V. alginolyticus* ở pha tăng trưởng OD₆₀₀=0,6, ủ lactic hỗn hợp trong tủ nuôi 37°C qua đêm. Sau khi ủ, hỗn hợp được chuyển vào ống falcon 15 ml và ly tâm ở tốc độ 8000 x g trong 10 phút ở 4°C, dịch nổi ly tâm được thu sang ống falcon mới và ly tâm lần hai. Lọc dịch nổi ly tâm qua màng lọc 0,22 μm để loại bỏ hoàn toàn vi khuẩn còn sót lại để chuẩn bị thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

Kiểm tra sự có mặt của thể thực khuẩn trong mẫu: Chuẩn bị đĩa thạch hai lớp bằng cách lấy 0,1 ml canh trường *V. alginolyticus* ở pha logarit trộn đều với 5 ml môi trường LB chứa 3% NaCl 0,6% agar (ủ ở bể ổn nhiệt 55°C), sau đó đổ hỗn hợp môi trường

vi khuẩn vào đĩa thạch cứng LB 3% NaCl. Nhỏ 10 μl dịch làm giàu thể thực khuẩn lên đĩa, để khô trong 15 phút. Ủ đĩa thạch ở 37 trong 18 giờ và quan sát vùng ly giải trên đĩa (nếu có).

Phân lập thể thực khuẩn: Lấy 0,1 ml canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* ở pha tăng trưởng ủ trong 15 phút với 0,1 ml dịch làm giàu thể thực khuẩn. Bổ sung vào hỗn hợp trên 5 ml môi trường MLB 0,6% agar, đảo trộn đều và đổ ra đĩa thạch cứng MLB (1% peptone, 0,5% cao nấm men, 3% NaCl, 1,5% thạch). Ủ các đĩa thạch ở tủ nuôi 37°C trong 18 giờ. Quan sát các vết tan trên đĩa. Dùng que cấy cắt vết tan riêng rẽ cho vào 1 ml đệm SM, đảo trộn kỹ và ủ ở 40°C trong 30 phút. Hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 8000 x g trong 5 phút, 4°C. Dịch nổi ly tâm được thu lại để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Lấy 0,1 ml dịch nổi ly tâm trộn đều với 0,1 ml canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* ở pha tăng trưởng trong 10 ml môi trường MLB. Ủ lactic hỗn hợp ở 37°C, qua đêm. Hỗn hợp sau đó được ly tâm, thu dịch nổi và lọc qua màng 0,22 μm. Dịch lọc được bảo quản bằng cách bổ sung đệm SM theo tỷ lệ 1:1 và để ở tủ lạnh 4°C.

2.2.3. Đánh giá phổ vật chủ

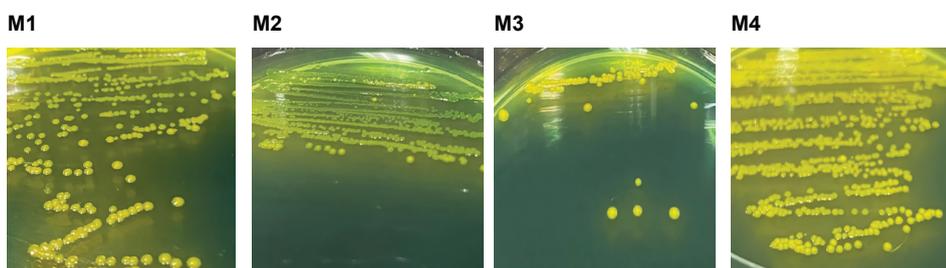
Các vật chủ được sử dụng để đánh giá tính đặc hiệu của thể thực khuẩn phân lập được bao gồm các chủng thuộc chi *Vibrio*: *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562; và các chủng probiotics: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*. Quy trình kiểm tra khả năng xâm nhiễm của thể thực khuẩn được thực hiện như quy trình kiểm tra sự có mặt của thể thực khuẩn trong mẫu được mô tả ở trên.

2.2.4. Đánh giá hoạt tính ly giải tế bào chủ.

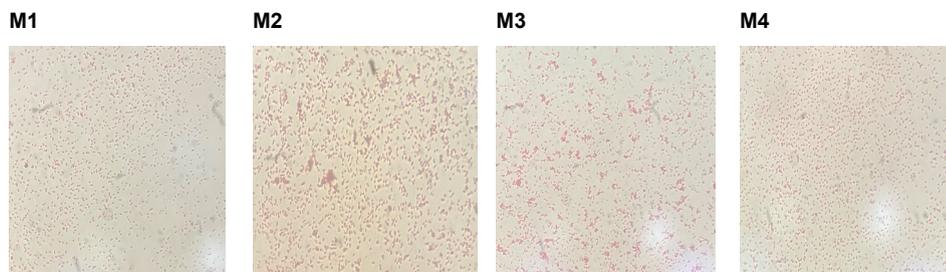
Canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* ở pha tăng trưởng được bổ sung dịch thể thực khuẩn, hỗn hợp được nuôi lactic ở 37°C. Tiến hành lấy mẫu mỗi giờ 1 lần, mẫu được đo và ghi lại giá trị. Số liệu được phân tích dựa trên kết quả so sánh giá trị của mẫu kiểm chứng âm (không bổ sung thể thực khuẩn) với các mẫu thí nghiệm có bổ sung thể thực khuẩn.

2.2.5. Đánh giá độ bền của thể thực khuẩn đối với nhiệt độ và pH

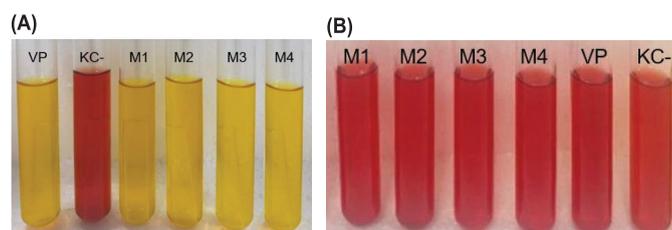
Độ bền nhiệt và pH của chủng thể thực khuẩn được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi A.J. Kurek và cs 2016 [16]. Độ bền nhiệt của thể thực khuẩn được thực hiện bằng cách ủ dung dịch thể thực khuẩn ở các nhiệt độ -20, 4, 25, 37, 60 và 80°C trong thời gian 2 giờ. Đối với độ bền pH, thể thực khuẩn được giữ trong đệm có pH 2, 4, 6, 7, 8 và 10 trong thời gian 2 giờ. Sau khi thách thức ở các nhiệt độ và pH khác nhau, lượng thể thực khuẩn được xác định theo phương pháp thạch hai lớp. Tỷ lệ sống của thể thực khuẩn được xác định bằng cách chia hiệu giá thể thực khuẩn trong mẫu xử lý cho hiệu giá thể thực khuẩn trong mẫu kiểm chứng. Thể thực khuẩn trong điều kiện nhiệt độ 4°C và pH 7 được coi là điều kiện kiểm chứng vì hiệu giá không thay đổi so với trước xử lý.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn trên môi trường TCBS. M1, M2, M3, và M4 là 4 mẫu nước từ các đầm nuôi tôm.



Hình 2. Hình thái tế bào vi khuẩn. M1, M2, M3, và M4 là 4 mẫu nước từ các đầm nuôi tôm.



Hình 3. Khả năng lên men đường glucose (A) và đường lactose (B). Các chủng phân lập M1, M2, M3, và M4. VP: chủng chuẩn *V. parahaemolyticus* ATCC17802. KC-: mẫu kiểm chứng âm (không bổ sung vi khuẩn).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập *Vibrio alginolyticus* từ nước đầm nuôi tôm

3.1.1. Phân lập trên môi trường chọn lọc

Bốn mẫu nước từ đầm nuôi tôm đã được sử dụng để phân lập *V. alginolyticus*. Mẫu nước được pha loãng theo bậc 10 và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc ở điều kiện 37°C trong 18 giờ. Bốn khuẩn lạc đơn sinh trưởng trên môi trường chọn lọc được lựa chọn và tiếp tục được cấy rìa làm sạch trên môi trường chọn lọc TCBS. Kết quả cho thấy, xuất hiện các khuẩn lạc màu vàng, tròn, nhẵn trên môi trường thạch đĩa (hình 1). Sự xuất hiện khuẩn lạc màu vàng là do khả năng lên men sucrose của vi khuẩn và sinh axit. Trong môi trường TCBS có các chất chỉ thị màu phụ thuộc pH là bromothymol blue và thymol blue, khi vi khuẩn lên men sucrose sẽ sinh axit làm giảm pH của môi trường xung quanh, từ đó làm cho chất chỉ thị màu chuyển từ màu xanh sang vàng, dẫn đến hình thành khuẩn lạc màu vàng. Nhiều nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng *V. alginolyticus* là loài vi khuẩn có khả năng lên men sucrose [17].

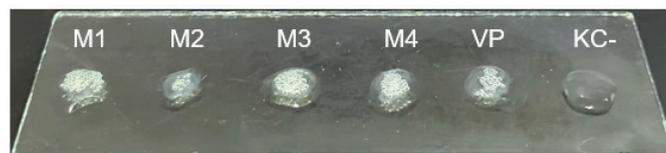
Tế bào vi khuẩn từ 4 mẫu nước được nhuộm Gram và kết quả cho thấy, cả 4 mẫu đều là các vi khuẩn hình que, cong nhẹ ở một đầu và là vi khuẩn Gram âm (hình 2). Đặc điểm hình thái tế bào này là phù hợp với hình thái của *V. alginolyticus*.

3.1.2. Xác định một số đặc điểm sinh hoá

Lên men đường glucose và lactose: Bốn chủng vi khuẩn được lựa chọn được lên men trong môi trường có chất chỉ thị là đỏ phenol và sử dụng nguồn carbon duy nhất là glucose. Sau khi lên men thì cả 4 canh trường nuôi cấy đều chuyển từ màu đỏ sang vàng và không có hiện tượng sinh khí khi sử dụng ống Durham. Sự chuyển màu của môi trường là do vi khuẩn này có

khả năng lên men glucose sinh axit, nên làm giảm pH của môi trường, dẫn đến làm cho chất chỉ thị đỏ Phenol chuyển từ màu đỏ sang màu vàng. Tuy nhiên, khi sử dụng lactose làm nguồn carbon cho quá trình lên men thì cả 4 chủng vi khuẩn đều không làm đổi màu của môi trường. Kết quả này cho thấy, cả bốn chủng được lựa chọn đều không có khả năng lên men lactose. Trong quá trình lên men cả 4 chủng cũng không sinh khí trên môi trường có đường lactose (hình 3B). Nghiên cứu của O. Erkmen (2022) [18] đã chỉ ra rằng, các loài *Vibrio* đều có khả năng lên men glucose nhưng không lên men đường lactose và không sinh khí.

Khả năng tổng hợp catalase: Catalase là các enzyme có vai trò ngăn cản sự oxy hoá tế bào bằng cách phân giải hydrogen peroxide thành nước và oxy. Tất cả các loài, trong đó có *Vibrio*, có khả năng tổng hợp catalase [13], thì khi H₂O₂ được nhỏ vào lam kính có chứa vi khuẩn bột khí sẽ xuất hiện. Kết quả thử nghiệm cho thấy, cả bốn chủng phân lập đều có khả năng sinh catalase. Thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp catalase cũng được thực hiện với chủng *V. parahaemolyticus* ATCC17802, kết quả cho thấy khả năng sinh tổng hợp catalase là rõ ràng (hình 4).



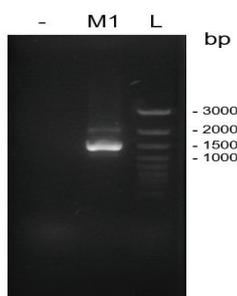
Hình 4. Khả năng sinh tổng hợp catalase. Các chủng phân lập M1, M2, M3, và M4. VP: chủng chuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802. KC-: mẫu kiểm chứng âm.

3.1.3. Định danh vi khuẩn

Từ các kết quả thu được ở trên cho thấy, bốn chủng phân lập được từ đầm nuôi tôm đều có đặc điểm của *V. alginolyticus* với các đặc tính như hình thành khuẩn lạc màu vàng trên môi trường TCBS, Gram âm, hình que cong, lên men glucose, không lên men lactose, không sinh khí và có hoạt tính catalase (bảng 1). Cả bốn chủng này đều có đặc tính giống nhau nên chủng M1 được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu giải trình tự 16S rDNA phục vụ cho việc định danh. DNA tổng số tách chiết từ sinh khối chủng M1 với nồng độ 448 ng/μl, tỷ lệ A260/A230 và A260/A280 đạt là 2,0 và 1,85 tương ứng được sử dụng làm khuôn để khuếch đại đoạn gen 16S rDNA. Kết quả cho thấy đã khuếch đại thành công đoạn gen đích, với kích thước khoảng gần 1500 bp, phù hợp với kích thước đoạn gen đích rDNA cần khuếch đại sử dụng cặp mồi 27F/1492R (hình 5). Trình tự đoạn gen đích đã được xác định và tiến hành so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy, trình tự 16S rDNA của chủng M1 có độ tương đồng 99,47% so với chủng *V. alginolyticus* 2014V-1011 với mã số CP046772.1. Từ các kết quả thu được có thể kết luận rằng, đã phân lập được chủng *V. alginolyticus* M1 từ đầm nuôi tôm. Chủng vi khuẩn này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu phân lập các thể thực khuẩn đặc hiệu.

Bảng 1. Đặc tính của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

Chủng	Lên men glucose	Lên men lactose	Sinh khí	Sinh catalase
M1	+	-	-	+
M2	+	-	-	+
M3	+	-	-	+
M4	+	-	-	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC17802	+	-	-	+
Kiểm chứng âm (KC-)	-	-	-	-

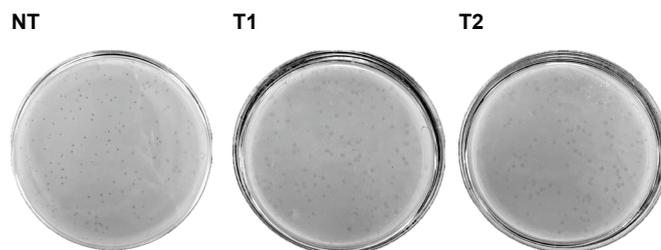


Hình 5. Ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rDNA. M1: mẫu DNA khuôn từ chủng M1; (-): mẫu kiểm chứng âm; L: thang DNA chuẩn 100 bp (Thermo Scientific, Mỹ).

3.2. Phân lập thể thực khuẩn đặc hiệu *Vibrio alginolyticus*

Chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* M1 được sử dụng để phân lập các thể thực khuẩn đặc hiệu theo phương pháp thạch hai lớp. Kết quả cho thấy, xuất hiện nhiều vết tan trên môi trường thạch hai lớp sau 18 giờ ủ ở điều kiện 37°C (hình 6). Điều đó

chứng tỏ cả ba mẫu nghiên cứu đều chứa thể thực khuẩn. Một số đồng tạo vết tan lớn được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo bao gồm NT1, NT4, T13 và T23.



Hình 6. Hình ảnh vết tan trên thạch hai lớp. NT, T1 và T2 là các mẫu nước dùng để phân lập thể thực khuẩn.

3.3. Xác định tính đặc hiệu chủng chủ của thể thực khuẩn

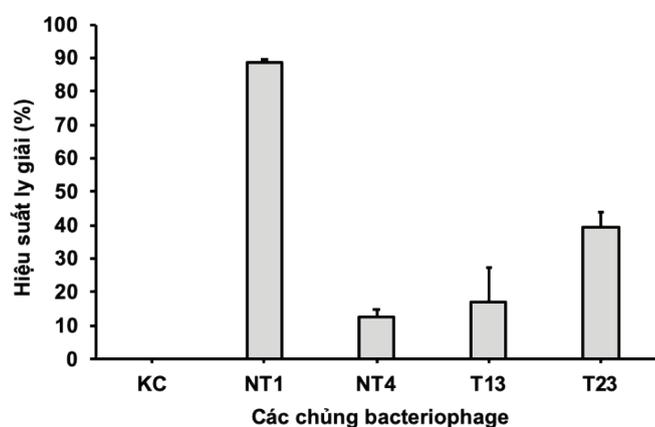
Tính đặc hiệu của thể thực khuẩn là một trong những phương diện quan trọng cần được quan tâm trong quá trình ứng dụng thể thực khuẩn. Các thể thực khuẩn có tính đặc hiệu cao luôn được quan tâm và lựa chọn vì khi các chủng này được ứng dụng nó chỉ tác động lên một/hoặc một số loài vi khuẩn chủ nhất định, mà không ảnh hưởng đến các vi khuẩn chủ khác, đặc biệt là các vi khuẩn có lợi. Mục tiêu của chúng tôi là tìm kiếm các thể thực khuẩn đặc hiệu *V. alginolyticus*, do đó trong nghiên cứu này bốn chủng thể thực khuẩn được thử hoạt tính ly giải với 4 loài thuộc chi *Vibrio* và 2 loài thuộc chi *Bacillus*. Kết quả cho thấy, không xuất hiện vết tan ở các chủng thuộc chi *Vibrio* như *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 và các chủng probiotics thuộc chi *Bacillus* như *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* (bảng 2). Điều đó chứng tỏ các chủng thể thực khuẩn được phân lập là đặc hiệu với *V. alginolyticus*. Tính đặc hiệu của thể thực khuẩn với các loài *Vibrio* cũng đã được quan sát ở các nghiên cứu trước [3, 19]. Điểm đáng chú ý là các chủng thể thực khuẩn không xâm nhiễm các chủng probiotics thuộc chi *Bacillus*. Điều này cho thấy chủng thể thực khuẩn là an toàn đối với *Bacillus* nên có thể sử dụng cùng với các chủng probiotics này cho thủy sản.

Bảng 2. Phổ vật chủ đối với các chủng thể thực khuẩn.

Các chủng vi khuẩn	Các chủng thể thực khuẩn			
	NT1	T13	T23	NT4
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> BL	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> ATCC 14733	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-
<i>V. alginolyticus</i> M1	+	+	+	+

3.4. Hoạt tính ly giải tế bào chủ của các chủng thể thực khuẩn phân lập

Hoạt tính ly giải đối với vật chủ *V. alginolyticus* M1 được thực hiện trên môi trường dịch lỏng. Kết quả cho thấy, các chủng phân lập khác nhau có hoạt tính ly giải tế bào chủ là khác nhau. Hoạt tính ly giải mạnh nhất là chủng NT1 với hiệu suất ly giải đạt 90%; tiếp theo là các chủng T23, T13 và NT4 với hiệu suất ly giải lần lượt là 39, 17 và 13% tương ứng (hình 7).



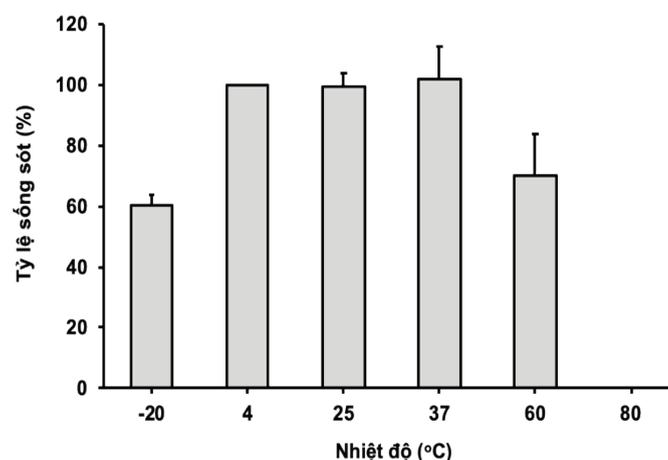
Hình 7. Hoạt tính ly giải tế bào chủ của các chủng thể thực khuẩn phân lập. KC: mẫu kiểm chứng âm canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* M1 không bổ sung thể thực khuẩn; các mẫu NT1, NT4, T13, T23 là các mẫu canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* M1 có bổ sung các chủng thể thực khuẩn NT1, NT4, T13, T23 tương ứng.

Hoạt tính ly giải tế bào chủ đạt trên gần 90% cũng nhận được đối với chủng thể thực khuẩn kháng *V. parahaemolyticus* trong các nghiên cứu trước đây [3]. Các chủng thể thực khuẩn khác nhau có hoạt tính ly giải tế bào chủ *V. alginolyticus* là khác nhau cũng được quan sát thấy trong nghiên cứu của S. Droubogiannis và cs (2022) [20]. Từ kết quả thu được, chủng thể thực khuẩn NT1 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.5. Độ bền nhiệt và pH của chủng thể thực khuẩn phân lập

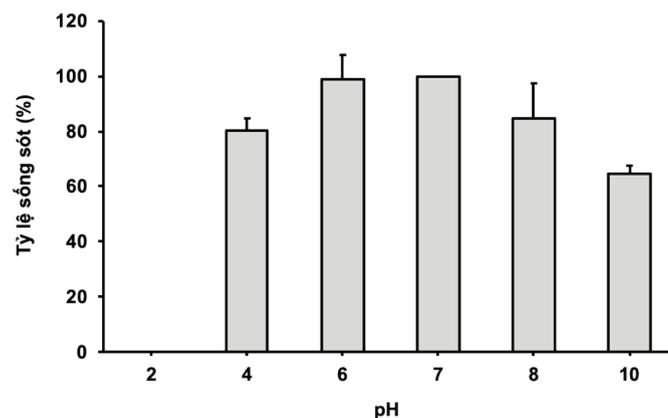
Độ bền nhiệt và pH của chủng thể thực khuẩn NT1 được đánh giá trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, chủng NT1 vẫn giữ được độ bền tương đối ở các điều kiện nhiệt độ khảo sát khác nhau 4, 25, và 37°C. Độ bền nhiệt của thể thực khuẩn này giảm đi ở điều kiện -20°C và nhiệt độ 60°C; tỷ lệ sống sót chỉ còn khoảng 60-70%. Đặc biệt, M1 bị chết hoàn toàn ở 80°C (hình 8). Kết quả này là phù hợp với kết quả nghiên cứu về *V. parahaemolyticus* phage vB_VpaP_GHSM17 trong nghiên cứu của X. Liang và cs (2022) [4]. Độ bền nhiệt của M1 giảm đi ở nhiệt độ cao trong nghiên cứu này cũng tương tự như phage VA5 trong

nghiên cứu của Q. Hao và cs (2023) [6], và các chủng phage trong nghiên cứu của R. Gao và cs (2024) [7]. Tỷ lệ sống sót của phage Vp08 và Vp11 chỉ là 31,16 và 49,96%, tương ứng ở điều kiện 60°C; tất cả các thể thực khuẩn trong nghiên cứu của C.W. Tan và cs (2021) [3], đều bị bất hoạt và mất khả năng xâm nhiễm khi xử lý ở điều kiện 70°C. Thể thực khuẩn S1R3Y kháng *V. alginolyticus* phân lập từ mẫu nước thải tại chợ hải sản Đại Liên và vB_VpaP_SJSY21 kháng *V. parahaemolyticus* phân lập từ chợ hải sản Tam Á, Trung Quốc cũng bị bất hoạt hoàn toàn ở 70°C [5, 21].



Hình 8. Độ bền nhiệt của chủng thể thực khuẩn NT1 ở các nhiệt độ khác nhau: -20, 4, 25, 37, 60 và 80°C.

Đối với độ bền pH, thể thực khuẩn NT1 có khả năng chịu được trong một dải pH 4-10 (hình 9). Tỷ lệ sống sót vẫn đạt 80-100% trong khoảng pH 4-8, tỷ lệ này giảm xuống còn 64,5% ở điều kiện pH 10 và đặc biệt thể thực khuẩn NT1 bị chết hoàn toàn khi giữ ở pH 2 trong thời gian 2 giờ. Độ bền pH của thể thực khuẩn NT1 hoàn toàn phù hợp với chủng phage S1R3Y kháng *V. alginolyticus* trong nghiên cứu của Y. Ren và cs (2022) [5]. Độ bền pH là khác nhau đối với các



Hình 9. Độ bền pH của chủng thể thực khuẩn NT1 ở các điều kiện pH khác nhau: 2, 4, 6, 7, 8 và 10.

chủng phage khác nhau. Tương tự như chủng NT1 trong nghiên cứu này, các chủng thể thực khuẩn trong nghiên cứu của C.W. Tan và cs (2021) [3] đều bị bất hoạt ở pH 2, hai trong số ba chủng phage trong nghiên cứu của R. Gao và cs (2024) [7], cũng bị bất hoạt ở pH 2 này [7], trong khi đó chủng thể thực khuẩn VA5 vẫn sống sót ở pH 2 và thậm chí là pH 1 [6]. Ngược lại, các chủng thể thực khuẩn trong nghiên cứu của C.W. Tan và cs (2021) [3] có tỷ lệ sống sót gần như 100% ở pH 11, trong khi đó chủng VA5 giảm khá nhiều tại pH này. Từ các kết quả thu được trong nghiên cứu này và các nghiên cứu trước đây về độ bền nhiệt độ và pH của các chủng thể thực khuẩn đưa đến kết luận rằng, đối với mỗi chủng phage khác nhau đều có đặc tính về độ bền nhiệt độ và pH khác nhau, cần phải được nghiên cứu để lựa chọn ra điều kiện thích hợp cho mỗi chủng phage được phân lập.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và định danh được chủng *V. alginolyticus* M1 từ mẫu nước đầm nuôi tôm tại Hải Phòng. Sử dụng *V. alginolyticus* M1 làm chủng chủ, chúng tôi cũng phân lập được 4 dòng thể thực khuẩn đặc hiệu. Cả bốn dòng lựa chọn đều không có hoạt tính ly giải một số chủng thuộc chi *Vibrio* như *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 và các chủng probiotics thuộc chi *Bacillus* như *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*. Dòng thể thực khuẩn NT1 có tính bền nhiệt cao lên đến 60°C và phổ pH rộng (pH 3-10), do đó được xem là ứng viên cho phát triển giải pháp sinh học thay thế kháng sinh trong phòng và trị bệnh do *V. alginolyticus* gây ra trên thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Thitamadee, A. Prachumwat, J. Srisala, et al. (2016), "Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia", *Aquaculture*, **452**, pp.69-87, DOI: 10.1016/J.AQUACULTURE.2015.10.028.

[2] M. Yang, Y. Liang, S. Huang, et al. (2020), "Isolation and characterisation of the novel phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for lysing *Vibrio parahaemolyticus*", *Front. Microbiol.*, **11**, DOI: 10.3389/FMICB.2020.00259/BIBTEX.

[3] C.W. Tan, Y. Rukayadi, H. Hasan, et al. (2021), "Isolation and characterization of six *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophages from seafood samples", *Front. Microbiol.*, **12**, DOI: 10.3389/FMICB.2021.616548/BIBTEX.

[4] X. Liang, Y. Wang, B. Hong, et al. (2022), "Isolation and characterisation of a lytic *Vibrio parahaemolyticus* phage vB_VpaP_GHSM17 from sewage samples", *Viruses*, **14**(8), DOI: 10.3390/V14081601.

[5] Y. Ren, L. Wang, R. Chen, et al. (2022), "Isolation and characterisation of a novel phage vB_ValP_VA-RY-3 infecting *Vibrio alginolyticus*", *Virus Res.*, **322**, DOI: 10.1016/J.VIRUSRES.2022.198945.

[6] Q. Hao, Y. Bai, H. Zhou, et al. (2023), "Isolation and characterisation of bacteriophage VA5 against *Vibrio alginolyticus*", *Microorg.*, **11**(12), DOI: 10.3390/MICROORGANISMS11122822.

[7] R. Gao, K. Sun, A. Abdalla, et al. (2024), "Isolation, characterisation, and preliminary application of three *Vibrio* phages in controlling *Vibrio alginolyticus*", *LWT*, **191**, DOI: 10.1016/J.LWT.2023.115638.

[8] J.L.V. Aguilar, G.M. Pech, I.L. Rosas, et al. (2022), "Phage therapy for crops: Concepts, experimental and bioinformatics approaches to direct its application", *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(1), DOI: 10.3390/IJMS24010325.

[9] P. Rogovski, R. Cadamuro, R.D. Silva, et al. (2021), "Uses of bacteriophages as bacterial control tools and environmental safety indicators", *Front. Microbiol.*, **12**, DOI: 10.3389/FMICB.2021.793135.

[10] A. Sulakvelidze (2013), "Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens", *J. Sci. Food Agric.*, **93**(13), pp.3137-3146, DOI: 10.1002/JSFA.6222.

[11] M. Kazi, U.S. Annapure (2023), "Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens", *J. Food Sci. Technol.*, **53**(3), DOI: 10.1007/S13197-015-1996-8.

[12] P.C. Artawinata, S. Lorraine, D.E. Waturangi (2023), "Isolation and characterization of bacteriophages from soil against food spoilage and foodborne pathogenic bacteria", *Sci. Rep.*, **13**(1), DOI: 10.1038/S41598-023-36591-6.

[13] S.T. Abedon (2019), "Use of phage therapy to treat long-standing, persistent, or chronic bacterial infections", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **145**, pp.18-39, DOI: 10.1016/J.ADDR.2018.06.018.

[14] L.K. Harada, E. Silva, W. Campos, et al. (2018), "Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art", *Microbiol. Res.*, **213**(212), pp.38-58, DOI: 10.1016/J.MICRES.2018.04.007.

[15] Y. Huang, W. Wang, Z. Zhang, et al. (2022), "Phage products for fighting antimicrobial resistance", *Microorganisms*, **10**(7), DOI: 10.3390/MICROORGANISMS10071324.

[16] A.J. Kurek, T. Gasior, B. Nejman, et al. (2016), "Biodiversity of bacteriophages: Morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage", *Sci. Reports*, **6**(1), pp.1-17, DOI: 10.1038/srep34338.

[17] H. Chart (2012), "Vibrio, mobiluncus, gardnerella and spirillum: Cholera; vaginosis; rat bite fever", *Med. Microbiol.*, pp.314-323, DOI: 10.1016/B978-0-7020-4089-4.00045-7.

[18] O. Erkmén (2022), "Isolation and counting of *Vibrio*", *Microbiol. Anal. Foods Food Process. Environ.*, pp.253-268, DOI: 10.1016/B978-0-323-91651-6.00012-4.

[19] A. Dias, T.J. Duarte, D. Trindade, et al. (2024), "Bacteriophages to control *Vibrio alginolyticus* in live feeds prior to their administration in larviculture", *J. Appl. Microbiol.*, **135**(5), DOI: 10.1093/JAMBIO/LXAE115.

[20] S. Droubogiannis, L. Pavlidi, M. Tsertou, et al. (2022), "Vibrio phage artemius, a novel phage infecting *Vibrio alginolyticus*", *Pathogens*, **11**(8), DOI: 10.3390/PATHOGENS11080848.

[21] Y. Xu, J. Sun, J. Hu, et al. (2023), "Characterisation and preliminary application of a novel lytic *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage vB_VpaP_SJSY21", *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(24), DOI: 10.3390/IJMS242417529.