

STUDYING ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BACTERIOPHAGES ON MULTI-ANTIBIOTIC RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM TRA FISH (*Pangasius hypophthalmus*)

Tong Thi Anh Ngoc, Nguyen Cam Tu, Nguyen Cong Ha, Nguyen Thi Thu Nga*
Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 10/01/2021 Revised: 10/3/2021 Published: 29/4/2021	This study aims to investigate the inactivation ability of bacteriophages derived from the natural environment on pathogenic bacteria isolated from <i>Pangasius</i> farming and processing chain. The inactivation ability of bacteriophages was specifically studied on multi-antibiotic resistant <i>Escherichia coli</i> strain at different doses of phage (0-100 µL), initial bacteria counts (2, 3 and 4 log CFU/mL) and incubation temperature (37 and 7 ± 1°C). The results showed that a variety of the isolated bacteria were infected by bacteriophages from pond water, mud bottom and <i>Pangasius</i> feces, such as: <i>Escherichia coli</i> (12/18); <i>Vibrio cholerae</i> (1/8); <i>Staphylococcus aureus</i> (1/7) and <i>Salmonella</i> spp. (4/9). In addition, the results showed a reduction of multi-antibiotic resistant <i>E. coli</i> 80ENV strain, depending on phage doses, bacterial quantity, incubation temperature and exposure time. Antimicrobial activity of phages at 7 ± 1°C was better than 37°C and the best activity within 2 hours. Overall, the results indicate that the bacteriophages may be useful in the control of food-borne pathogens and antibiotic resistant bacteria.
KEYWORDS Bacteriophage <i>Escherichia coli</i> Multi-antibiotic resistance <i>Pangasius</i> fish Pathogens	

NGHIÊN CỨU HOẠT ĐỘNG XÂM NHIỄM CỦA THỰC KHUẨN THỂ ĐỐI VỚI VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* ĐA KHÁNG THUỐC PHÂN LẬP TỪ CÁ TRA (*Pangasius hypophthalmus*)

Tổng Thị Ánh Ngọc, Nguyễn Cẩm Tú, Nguyễn Công Hà, Nguyễn Thị Thu Nga*
Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 10/01/2021 Ngày hoàn thiện: 10/3/2021 Ngày đăng: 29/4/2021	Nghiên cứu này khảo sát khả năng xâm nhiễm (vô hoạt) của thực khuẩn thể (phage) có nguồn gốc từ môi trường tự nhiên đối với các loài vi khuẩn gây bệnh phân lập từ chuỗi nuôi trồng và chế biến cá Tra. Nghiên cứu tập trung khảo sát khả năng phân giải của phage trên vi khuẩn <i>Escherichia coli</i> đa kháng thuốc ở các liều lượng phage (0-100 µL), mật số vi khuẩn (2, 3 và 4 log CFU/mL) và nhiệt độ (37 và 7 ± 1°C). Kết quả cho thấy đa dạng các loài vi khuẩn được phân lập bị xâm nhiễm bởi các thực khuẩn thể từ nước ao nuôi, bùn đáy và phân cá Tra, cụ thể là: 12/18 chủng <i>Escherichia coli</i>; 1/8 chủng <i>Vibrio cholerae</i>; 1/7 chủng <i>Staphylococcus aureus</i> và 4/9 chủng <i>Salmonella</i> spp. Khi nghiên cứu trên vi khuẩn <i>E. coli</i> 80ENV đa kháng thuốc, khả năng phân giải của phage phụ thuộc vào liều lượng thực khuẩn thể, mật số vi khuẩn ban đầu, nhiệt độ ủ và thời gian tiếp xúc. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng thực khuẩn thể để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh và vi khuẩn kháng thuốc.
TỪ KHÓA Cá Tra Đa kháng thuốc <i>Escherichia coli</i> Thực khuẩn thể Vi khuẩn gây bệnh	

* Corresponding author. Email: nttnga@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

Thực khuẩn thể (bacteriophage hoặc phage) là virus chỉ có khả năng xâm nhiễm (ký sinh) và nhân lên bên trong tế bào vi khuẩn [1]. Thực khuẩn thể tương đối an toàn, không độc hại và vô hại đối với động vật, thực vật và con người [2]. Thực khuẩn thể được ứng dụng trong ba lĩnh vực của ngành công nghiệp thực phẩm: sản xuất sơ chế, vệ sinh sinh học và bảo quản sinh học. Trong sản xuất sơ chế, phage được thêm vào trong quá trình sinh trưởng của thực vật hoặc động vật để giảm thiểu tỷ lệ mắc bệnh ở thực vật hoặc động vật. Phage cũng có thể được áp dụng trong quá trình chế biến và đóng gói thực phẩm để kiểm soát sự ô nhiễm bởi các mầm bệnh tiềm ẩn. Ngoài ra, phage hoặc enzyme (depolymerases và endolysins) do chúng tạo ra được sử dụng để ngăn chặn sự hình thành màng sinh học (biofilm) trên bề mặt của thiết bị sản xuất và chế biến thực phẩm. Trong bảo quản, phage được sử dụng để kéo dài hạn sử dụng của sản phẩm thực phẩm bằng cách tiêu diệt vi khuẩn gây hư hỏng và được xem là phương pháp bảo quản sinh học thay thế các loại hóa chất [3]-[5].

Trong thời gian gần đây, vấn đề an toàn sức khỏe cộng đồng được quan tâm, nhất là khả năng đa kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh trên các loại (bán) sản phẩm; do đó điều cần thiết là áp dụng các phương pháp sinh học như thực khuẩn thể trong kiểm soát các loại vi khuẩn gây bệnh đa kháng thuốc [3]. Cục An toàn Thực phẩm Châu Âu (EFSA) và Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã phê duyệt các loại thực khuẩn thể sử dụng trong lĩnh vực nông sản [6]. Nhiều nghiên cứu trước đây đã cho thấy khả năng tiêu diệt của thực khuẩn thể đối với các vi khuẩn gây bệnh từ thực phẩm, chẳng hạn như: *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* [3], [4], [7]. Nghiên cứu của Bigwood và cộng sự (2009) [8] cho thấy phage Cj6 có khả năng làm giảm đáng kể mật số vi khuẩn *Campylobacter* trên thịt bò tươi và thịt bò nấu chín. Nghiên cứu của O'Flynn và cộng sự (2004) [9] cho thấy khi sử dụng hỗn hợp phage e11/2, pp01 và e4/1c có thể tiêu diệt hoàn toàn vi khuẩn *E. coli* O157:H7 trên bề mặt mẫu thịt bò tươi (7/9 mẫu) ở 37°C; tuy nhiên ở nhiệt độ thấp 12°C, vi khuẩn bị ức chế phát triển thì hiệu quả phân giải của phage cũng giảm. Mặt khác, nghiên cứu của Bigwood và cộng sự (2008) [10] cho thấy phage P7 có khả năng làm giảm lượng vi khuẩn *Salmonella Typhimurium* từ 2 đến 3 log và > 5,9 log (CFU/cm²) trên các mẫu thịt bò tương ứng ở 5 và 24°C. Ngoài ra, khả năng tiêu diệt *S. Typhimurium* bằng phage FO1-E2 thì phụ thuộc vào loại thực phẩm cũng như nhiệt độ bảo quản [11]. Nghiên cứu của Soni và cộng sự (2010) [12] cho thấy phage Listex P100 đã làm giảm lượng vi khuẩn *L. monocytogenes* trên bề mặt cá phi lê: 1,4-2,0 log ở 4°C; 1,7-2,1 log ở 10°C và 1,6-2,3 log ở 22°C.

Những năm gần đây, tình trạng thiếu kiểm soát chặt chẽ việc sử dụng các chất kháng sinh đã dẫn đến sự xuất hiện của các vi khuẩn kháng thuốc, gây ra nguy cơ phổ biến các vi sinh vật kháng thuốc và là một trong những vấn đề nghiêm trọng toàn cầu đối với sức khỏe con người [13], [15]. Dư lượng kháng sinh cũng đã được báo cáo trong các sản phẩm cá Tra xuất khẩu [15]; vi khuẩn *E. coli* cũng đã được báo cáo là có khả năng truyền gen kháng thuốc kháng sinh trong cộng đồng vi khuẩn [16] và vi khuẩn đa kháng thuốc đã được tìm thấy trên cá Tra tươi, cá Tra phi lê xuất khẩu và trong nước ao nuôi cá [17]-[20]. Nghiên cứu của Salako và cộng sự (2020) [21] đã báo cáo 46-50% vi khuẩn *E. coli* là đa kháng thuốc (đề kháng từ ba loại kháng sinh trở lên) được phân lập từ quy trình chế biến cá Tra. Do đó, nghiên cứu này khảo sát tiềm năng ứng dụng thực khuẩn thể phân giải vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc được phân lập từ quy trình chế biến cá Tra.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Kiểm tra tính xâm nhiễm vi khuẩn và phân lập thực khuẩn thể

2.1.1. Chuẩn bị mẫu

Nguồn vi khuẩn: 18 chủng *Escherichia coli* kháng thuốc kháng sinh, 8 chủng *Vibrio cholerae*, 7 chủng *Staphylococcus aureus*, 9 chủng *Salmonella* spp. và 19 chủng *Listeria monocytogenes* được phân lập từ 135 mẫu cá Tra, 108 mẫu nước, 81 mẫu găng tay công nhân trong quy trình chế

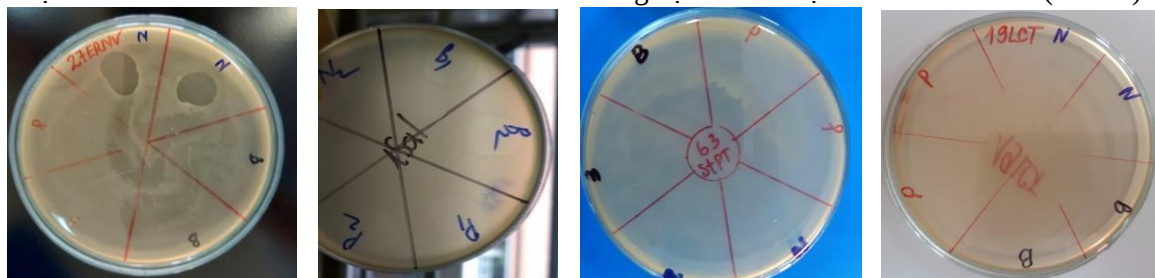
biển tại An Giang, Vĩnh Long và Đồng Tháp; và 30 mẫu ruột cá Tra thu thập tại An Giang và Vĩnh Long [22], [23] (cụ thể ở Bảng 1). Các khuẩn lạc thuần chủng của vi khuẩn được bảo quản ở 4°C trong thạch nghiêng Tryptone Soya Agar (TSA, Merck, Đức sản xuất). Vi khuẩn sẽ được tăng sinh trong 10 mL môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Đức sản xuất) và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Huyền phù vi khuẩn sau đó được pha loãng và so độ đục với ống chuẩn McFarland 0,5 (Nam Khoa, Việt Nam sản xuất), nồng độ vi khuẩn tương đương 10^8 CFU/mL.

Thực khuẩn thể: được thu thập trong môi trường tự nhiên từ các mẫu nước, bùn đáy ao và phân cá (ruột) trong chuỗi nuôi trồng cá Tra tại Tỉnh An Giang. Các mẫu này được xử lý tách cặn và tiêu diệt vi khuẩn bằng chloroform nhằm thu được thực khuẩn thể thô. Một hỗn hợp gồm 0,1 mL thực khuẩn thể thô; 0,1 mL từng chủng vi khuẩn thử nghiệm và 10 mL môi trường TSB được ủ lắc ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ nhằm làm tăng số lượng thực khuẩn thể. Sau đó ly tâm lần 1 với vận tốc 6.000 vòng/phút trong 5 phút, thu lấy phần dịch trong gồm thực khuẩn, vi khuẩn và được ly tâm lần 2 với vận tốc và thời gian như ly tâm lần 1 có bổ sung chloroform để tiêu diệt vi khuẩn, thu lấy phần dịch trong chứa thực khuẩn thể và bảo quản trong tối ở 4°C.

Thời gian thực hiện nghiên cứu: từ tháng 07 năm 2019 đến tháng 06 năm 2020.

2.1.2. Khảo sát tính xâm nhiễm vi khuẩn và phân lập thực khuẩn thể

Nghiên cứu kiểm tra tính xâm nhiễm vi khuẩn của thực khuẩn thể bằng khảo sát vết tan (plaque) theo phương pháp của Kropinski và cộng sự (2009) [24] với một số điều chỉnh. 10 μ L dung dịch chứa thực khuẩn thể được nhỏ giọt trên bề mặt thạch TSB 0,8% agar có hoà sẵn vi khuẩn thử nghiệm và ủ ở 37°C trong 24 giờ, sau đó quan sát sự hình thành vết tan (plaques). Thực khuẩn thể được xem là có tính xâm nhiễm đối với vi khuẩn thử nghiệm nếu có sự hình thành vết tan (Hình 1).



Hình 1. Tính xâm nhiễm của thực khuẩn thể có nguồn gốc từ môi trường tự nhiên đối với vi khuẩn thử nghiệm

Chú thích: 27ERNV, 1Sal, 63StPT và 19LCT là tên các chủng vi khuẩn thử nghiệm tương ứng với vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* và *L. monocytogenes*; N, B, P là nguồn gốc của thực khuẩn thể tương ứng với N: nước, B: bùn và P: phân cá

Sau khi xác định được tính xâm nhiễm của thực khuẩn trên vi khuẩn thử nghiệm (hay còn gọi là vi khuẩn kí chủ), các dòng thực khuẩn này sẽ được tiến hành phân lập bằng phương pháp đổ đĩa. Một hỗn hợp gồm 0,1 mL dung dịch thực khuẩn thể đã pha loãng thành dãy nồng độ thích hợp được đổ đĩa cùng với 0,1 mL vi khuẩn kí chủ bằng 10-12 mL môi trường TSB 0,8% agar, lắc kỹ và ủ trong 24 giờ ở 37°C. Sau ủ, từng vết tan riêng biệt được hoà tan với 1 mL nước cất đã khử trùng, lắc đều và giữ ở 4°C trong 24 giờ, tiến hành ly tâm hỗn hợp 2 lần như mô tả ở mục 2.1.1 và thu lấy phần dịch trong. Xác định các dòng thực khuẩn thể thuần bằng cách lặp lại các bước phân lập đến khi quan sát thấy có sự đồng đều về hình thái các vết tan để tách riêng các dòng thực khuẩn thể. Các dòng thực khuẩn thể này sau đó được cấy truyền (ziczac) trên bề mặt thạch TSB 0,8% agar có hoà sẵn vi khuẩn kí chủ để nhân mật số sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo [25].

2.2. Xác định khả năng phân giải vi khuẩn kí chủ của thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể (phage B80E7) phân lập từ mẫu bùn xâm nhiễm trên vi khuẩn *E. coli* 80ENV đã kháng thuốc được chọn để tiến hành thí nghiệm. Phage B80E7 đã tách riêng có mật số $9,4 \pm 0,6$

log PFU/mL, được bổ sung vào các ống nghiệm chứa 5 mL môi trường TSB ở các liều lượng phage theo thể tích: 0, 50, 75 và 100 μ L. Vi khuẩn kí chủ được bổ sung với mật số ban đầu là 2; 3 và 4 log CFU/mL. Tại các thời điểm: 0; 2; 4; 6; 20; 22 và 24 giờ ủ ở 37 và $7 \pm 1^\circ\text{C}$ thì mật số vi khuẩn kí chủ sống sót được phân tích để xác định khả năng phân giải của thực khuẩn thể.

Tính kháng thuốc của vi khuẩn *E. coli* 80ENV: đề kháng với bốn loại kháng sinh: ampicillin (10 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), chloramphenicol (30 μ g) và nalidixic acid (30 μ g).

2.3. Phân tích vi sinh vật

Mật số phage sử dụng trong thí nghiệm được xác định bằng phương pháp đổ đĩa sử dụng môi trường TSB 0,8% agar (như mô tả ở mục 2.1.2). Sau ủ, tất cả các vết tan (plaques) được đếm. Tương tự, mật số vi khuẩn được xác định theo phương pháp đổ đĩa sử dụng môi trường Plate Count Agar (PCA, Merck, Đức sản xuất) và ủ ở 37°C trong 48-72 giờ [26]. Sau ủ, tất cả các khuẩn lạc mọc trên môi trường được đếm. Mật số phage và vi khuẩn được tính như sau:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1.n_2).d.V}$$

Trong đó:

C: số khuẩn lạc hoặc vết tan đếm được trên đĩa Petri ở 2 nồng độ pha loãng liên tiếp

n_1 : số đĩa chọn đếm ở nồng độ đầu tiên

n_2 : số đĩa chọn đếm ở nồng độ kế tiếp

d: nồng độ pha loãng mà ở đó đĩa Petri đầu tiên được chọn để đếm

V: thể tích mẫu đổ đĩa (mL)

Kết quả của các lần lặp lại được tính toán trung bình ở dạng logarit ($\text{Log}_{10} N$) của số khuẩn lạc hoặc vết tan hình thành, nghĩa là log (CFU/mL) đối với vi khuẩn hoặc log (PFU/mL) đối với phage.

2.4. Xử lý số liệu

Kết quả mật số vi sinh vật được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của các lần lặp lại thông qua đồ thị vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2019; xử lý thống kê thông qua kiểm định ANOVA bằng phần mềm Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia) để kiểm tra sự khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức ($\alpha=0,05$).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính xâm nhiễm của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn thử nghiệm

Bảng 1. Tính xâm nhiễm của thực khuẩn thể trong nước, bùn và phân cá trên vi khuẩn phân lập từ chuỗi nuôi trồng và chế biến cá Tra

STT	Nguồn gốc	Công đoạn phân lập vi khuẩn	Số chủng vi khuẩn bị xâm nhiễm/ Tổng số chủng vi khuẩn thử nghiệm		
			Nước	Bùn	Phân cá
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	-	1/1	0/1	0/1
	Cá	Chỉnh hình	1/3	1/3	2/3
	Cá	Tiếp nhận	0/1	0/1	0/1
	Nước	Mạ băng	0/1	0/1	0/1
	Ruột cá	-	8/12	1/12	3/12
<i>V. cholerae</i>	Cá	Bao gói	0/2	0/2	0/2
	Tay	Bao gói	0/1	0/1	0/1
	Tay	Chỉnh hình	0/2	0/2	0/2
	Cá	Chờ đông	0/1	0/1	0/1
	Cá	Tiếp nhận	0/2	0/2	1/2
<i>S. aureus</i>	Tay	Bao gói	0/1	0/1	0/1
	Tay	Chỉnh hình	0/1	0/1	0/1
	Cá	Bao gói	0/4	0/4	1/4
	Cá	Chỉnh hình	0/1	0/1	0/1

STT	Nguồn gốc	Công đoạn phân lập vi khuẩn	Số chủng vi khuẩn bị xâm nhiễm/ Tổng số chủng vi khuẩn thử nghiệm		
			Nước	Bùn	Phân cá
<i>Salmonella</i> spp.	Cá	Chỉnh hình	0/2	1/2	2/2
	Tay	Phi lê	0/1	0/1	0/1
	Cá	Phi lê	0/1	0/1	0/1
	Nước	Xả máu	1/3	0/3	1/3
	Ruột cá	-	0/2	0/2	0/2
<i>L. monocytogenes</i>	Cá	Tiếp nhận	0/1	0/1	0/1
	Cá	Chờ đông	0/4	0/4	0/4
	Cá	Bao gói	0/7	0/7	0/7
	Cá	Phi lê	0/1	0/1	0/1
	Cá	Chỉnh hình	0/5	0/5	0/5
	Nước	Rửa l	0/1	0/1	0/1
Tỷ lệ chung			11/61 (18,0%)	3/61 (4,9%)	10/61 (16,4%)

Chú thích: Kết quả trong bảng là kết quả chung của 2 lần lặp lại

Tính xâm nhiễm của thực khuẩn thể từ các mẫu nước ao nuôi, bùn đáy ao và phân cá đối với vi khuẩn phân lập từ chuỗi nuôi trồng và chế biến cá Tra được thể hiện ở Bảng 1. Kết quả cho thấy, đa dạng các loài vi khuẩn khác nhau được phân lập có sự hiện diện của thực khuẩn thể từ môi trường tự nhiên, ngoại trừ vi khuẩn *L. monocytogenes*. Cụ thể, các thực khuẩn thể khác nhau có nguồn gốc từ nước, bùn và phân cá xâm nhiễm trên: 12/18 chủng *E. coli* (66,7%); trong đó thực khuẩn thể xâm nhiễm vi khuẩn *E. coli* phân lập từ ruột cá hiện diện với tần số cao trên mẫu nước (8/12 chủng); 1/8 chủng *V. cholerae* (12,5%); 1/7 chủng *S. aureus* (14,3%) và 4/9 chủng *Salmonella* spp. (44,4%). Các thực khuẩn thể từ mẫu nước ao nuôi có tỉ lệ xâm nhiễm chung cao nhất đối với các chủng vi khuẩn thử nghiệm (11/61 chủng; 18,0%); kế đến là thực khuẩn thể từ đường ruột của cá Tra (10/61 chủng; 16,4%) và bùn đáy ao (3/61 chủng; 4,9%) (Bảng 1). Trong phạm vi của nghiên cứu này, khả năng phân giải của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc từ quy trình chế biến cá Tra được thử nghiệm. Nghiên cứu khả năng phân giải của thực khuẩn thể đối với các vi khuẩn gây bệnh khác như: *V. cholerae*, *S. aureus* và *Salmonella* spp. được đề nghị thực hiện trong các nghiên cứu tiếp theo.

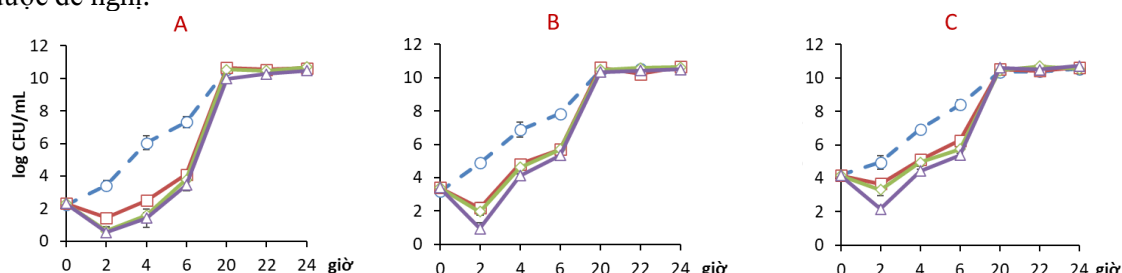
3.2. Khả năng phân giải của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc

Vi khuẩn đa kháng thuốc hiện là vấn đề toàn cầu dẫn đến sự quan tâm tới việc sử dụng thực khuẩn thể như một công cụ tiềm năng để chống lại các tác nhân gây bệnh có nguồn gốc từ vi khuẩn [3]; bao gồm các tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có nguồn gốc từ thực phẩm. Trong nghiên cứu này, khả năng phân giải của thực khuẩn thể B80E7 trên chủng vi khuẩn *E. coli* 80ENV đa kháng thuốc đã được nghiên cứu.

Nghiên cứu nhận thấy có hai kiểu hình thái vết tan của thực khuẩn thể (có nguồn gốc từ bùn đáy ao) xâm nhiễm trên vi khuẩn *E. coli* 80ENV. Cụ thể, kiểu hình thái vết tan HT01 có tâm trong (dòng thực khuẩn thể B80E4) và HT02 không có tâm trong (dòng thực khuẩn thể B80E7) với đường kính vết tan tương ứng là $1,3 \pm 0,15$ và $2,0 \pm 0,12$ mm sau 24 giờ ủ. Kiểu hình thái vết tan có tâm trong có thể hoặc do khả năng phân giải bị giảm bởi sự lão hoá của vi khuẩn hoặc do sự ức chế phân giải bởi sự khuếch tán và hoạt động của enzyme lipopolysaccharide depolymerase được sản sinh ra bởi thực khuẩn thể, phân hủy màng lipopolysaccharide của vi khuẩn tạo viên mờ [27], [28]. Kiểu hình thái vết tan không có tâm trong có thể là dòng thực khuẩn thể độc, chúng phá vỡ tế bào vi khuẩn kí chủ và phóng thích các thực khuẩn thể mới ra ngoài [27], [29].

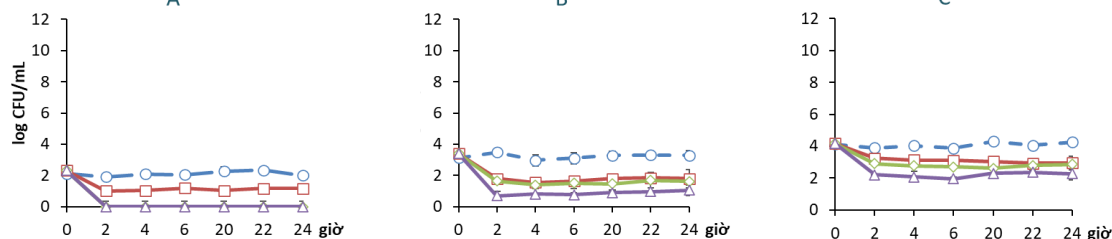
Sự khác nhau về hình thái vết tan tạo bởi các dòng thực khuẩn thể có thể là do sự khác nhau về cách thức xâm nhiễm cũng như về tốc độ sinh trưởng của thực khuẩn thể. Nghiên cứu của Jurczak-Kurek và cộng sự (2016) [27] cho thấy các dòng thực khuẩn thể được phân lập từ nước thải có bốn kiểu hình thái vết tan, trong đó có hai kiểu hình thái vết tan tương tự với kết quả của

nghiên cứu này. Như vậy, dựa trên hình thái vết tan, dòng thực khuẩn thể B80E7 đã được phân lập và nghiên cứu khả năng phân giải của nó đối với chủng *E. coli* 80ENV đa kháng thuốc. Kết quả về khả năng phân giải của thực khuẩn thể B80E7 đối với chủng *E. coli* 80ENV được thể hiện ở Hình 2 và 3. Nhìn chung, thực khuẩn thể B80E7 có khả năng phân giải tốt chủng *E. coli* 80ENV đa kháng thuốc và đã làm giảm mật số vi khuẩn ở tất cả các liều lượng bổ sung sau 2 giờ tiếp xúc và ở hai nhiệt độ khảo sát (37 và $7 \pm 1^\circ\text{C}$). Cụ thể, sau các khoảng thời gian 2, 4 và 6 giờ tiếp xúc ở 37°C (mật số vi khuẩn trung bình tương ứng là $2,0 \pm 1,1$; $3,7 \pm 1,5$ và $5,0 \pm 1,0$ log CFU/mL) thì ở các liều lượng thực khuẩn thể bổ sung đều cho thấy sự giảm mật số vi khuẩn với sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nghiệm thức không bổ sung thực khuẩn thể (mật số vi khuẩn tương ứng là $4,4 \pm 0,9$; $6,6 \pm 0,5$ và $7,8 \pm 0,5$ log CFU/mL; tuy nhiên mật số vi khuẩn bắt đầu tăng nhanh trở lại từ 2 đến 20 giờ và duy trì mật số từ 20 đến 24 giờ do mật số vi khuẩn đã đạt tối đa ở pha tăng trưởng [30] (Hình 2). Hiệu quả phân giải của thực khuẩn thể phụ thuộc vào tỉ lệ giữa phage và vi khuẩn [31], [32]. Trong khi, ở $7 \pm 1^\circ\text{C}$ thì sự giảm mật số vi khuẩn sau 2 giờ tiếp xúc ở tất cả liều lượng thực khuẩn thể ($1,2 \pm 1,3$ log CFU/mL) khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nghiệm thức không bổ sung thực khuẩn thể ($3,1 \pm 1,5$ log CFU/mL); sau đó mật số vi khuẩn được duy trì cho đến 24 giờ (Hình 3). Điều này là do phage phụ thuộc vào sự phát triển của vi khuẩn kí chủ để nhân lên, khi vật chủ phát triển nhanh sẽ thúc đẩy sự nhân lên của phage; khi ở nhiệt độ thấp thì tốc độ nhân lên của phage sẽ giảm đáng kể hoặc dừng lại do tốc độ tăng trưởng của vật chủ thấp [11], [33], [34]; kết luận này cũng tương đồng với kết quả trong nghiên cứu của O'Flynn và cộng sự (2004) [9]. Bên cạnh đó, thời gian cho toàn bộ chu kì sinh trưởng của thực khuẩn thể là khoảng những giờ đầu tiên sau khi tiếp xúc [35], do đó mật số vi khuẩn kí chủ sau 2 giờ tiếp xúc trong nghiên cứu này đã giảm xuống mức cao nhất. Trong nghiên cứu này, khảo sát thời gian tiếp xúc giữa thực khuẩn thể và vi khuẩn kí chủ với thời gian ngắn hơn 2 giờ được đề nghị.



Hình 2. Khả năng phân giải *E. coli* 80ENV của thực khuẩn thể B80E7 ở 37°C với mật số vi khuẩn ban đầu: A - 2 log, B - 3 log, C - 4 log

Chú thích: Lượng thực khuẩn thể bổ sung ○ 0, □ 50, ◇ 75, Δ 100 (μL)



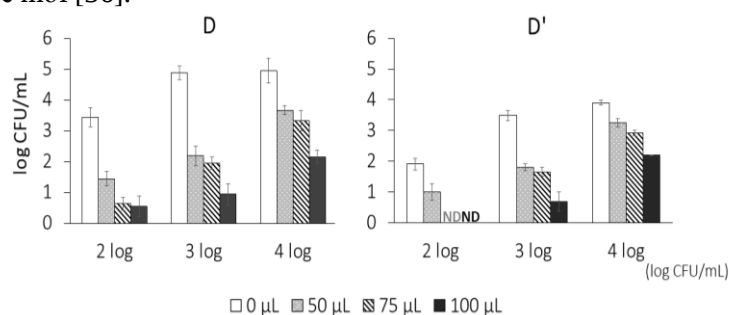
Hình 3. Khả năng phân giải *E. coli* 80ENV của thực khuẩn thể B80E7 ở $7 \pm 1^\circ\text{C}$ với mật số vi khuẩn ban đầu: A' - 2 log, B' - 3 log, C' - 4 log

Chú thích: Lượng thực khuẩn thể bổ sung ○ 0, □ 50, ◇ 75, Δ 100 (μL)

Hình 4 thể hiện mật số vi khuẩn *E. coli* 80ENV còn sống sót sau 2 giờ tiếp xúc với thực khuẩn thể ở 37°C (Hình 4 - D) và $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (Hình 4 - D).

Kết quả cho thấy, lượng thực khuẩn thể bổ sung, mật số vi khuẩn ban đầu, thời gian tiếp xúc và nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng phân giải của thực khuẩn thể. Ở 37°C , mật số vi khuẩn kí

chủ giảm nhiều nhất khi bổ sung thực khuẩn thể B80E7 với liều lượng 100 μL và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại (50 và 75 μL ; $p > 0,05$). Ở $7 \pm 1^\circ\text{C}$, khi bổ sung thực khuẩn thể B80E7 với liều lượng tăng dần từ 50 đến 100 μL thì mật số vi khuẩn kí chủ giảm có khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức ($p < 0,05$). Bên cạnh đó, ở các nghiệm thức có mật số vi khuẩn ban đầu thấp thì sự giảm mật số vi khuẩn đạt được cao hơn ($p < 0,05$). Ở $7 \pm 1^\circ\text{C}$, mật số vi khuẩn ban đầu là 2 log CFU/mL, liều lượng thực khuẩn thể B80E7 bổ sung là 75 và 100 μL thì sau 2 giờ tiếp xúc, mật số vi khuẩn đã giảm xuống dưới ngưỡng phát hiện (tương đương < 1 log CFU/10 mL; Hình 4 – D'), trong khi đó mật số vi khuẩn tương ứng ở 37°C là $1,5 \pm 0,3$ log CFU/10 mL (Hình 4 – D). Điều này có thể được giải thích do lượng thực khuẩn thể xâm nhiễm cao hơn dẫn đến sự phân bố của thực khuẩn thể trong môi trường tốt hơn làm tăng sự tiếp xúc của thực khuẩn thể với tế bào vi khuẩn nên chúng dễ liên kết hoặc bám vào các thụ thể trên bề mặt tế bào chủ và sau đó xâm nhiễm tế bào vi khuẩn kí chủ kết quả là tiêu diệt tế bào chủ và giải phóng các thực khuẩn thể mới [36].



Hình 4. Khả năng phân giải của thực khuẩn thể đối với *E. coli* kháng thuốc sau 2 giờ tiếp xúc ở 37°C (D) và $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (D')
 Chú thích: ND – mật số vi khuẩn ở dưới ngưỡng phát hiện

Kết quả trong nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Titze và cộng sự (2020) [37] khi sử dụng thực khuẩn thể để tiêu diệt vi khuẩn *S. aureus* trong sữa tiệt trùng cho thấy, với thể tích thực khuẩn thể bổ sung là 1 mL ($1,2 \cdot 10^9$ PFU/mL) dẫn đến sự giảm mật số vi khuẩn *S. aureus* tương ứng là 84,9% (S-7142) và 63,1% (S-10614) trong vòng 30 phút, 86,6% (S-7142) và 62,0% (S-10614) sau 2 giờ và 86,6% (S-7142) và 80,5% (S-10614) sau 8 giờ. Từ các kết quả thu nhận được cho thấy, khả năng phân giải của thực khuẩn thể B80E7 trên vi khuẩn *E. coli* 80ENV đa kháng thuốc phân lập từ cá Tra bị ảnh hưởng bởi mật số vi khuẩn ban đầu, lượng thực khuẩn thể bổ sung, thời gian tiếp xúc và nhiệt độ. Hiệu quả phân giải vi khuẩn kí chủ tốt hơn ở 7°C , mật số vi khuẩn ban đầu thấp (2 log CFU/mL) và thời gian phân giải tốt sau 2 giờ tiếp xúc với lượng thực khuẩn thể bổ sung ban đầu từ 75-100 μL . Nghiên cứu hiệu quả phân giải vi khuẩn kí chủ của thực khuẩn thể với thời gian tiếp xúc nhỏ hơn 2 giờ và trên các loại vi khuẩn gây bệnh khác nhau trong chuỗi thực phẩm (nuôi trồng, chế biến, bảo quản) được đề nghị. Nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng ứng dụng của thực khuẩn thể để tiêu diệt vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc.

4. Kết luận

Tóm lại, đa dạng các loài vi khuẩn khác nhau được phân lập từ chuỗi nuôi trồng và chế biến cá Tra có sự hiện diện của các thực khuẩn thể khác nhau có nguồn gốc từ nước, bùn và phân cá Tra ngoại trừ vi khuẩn *L. monocytogenes*, cụ thể là: 12/18 chủng *E. coli* (66,7%); 1/8 chủng *V. cholerae* (12,5%); 1/7 chủng *S. aureus* (14,3%) và 4/9 chủng *Salmonella* spp. (44,4%). Khi nghiên cứu trên vi khuẩn *E. coli* 80ENV đa kháng thuốc, kết quả cho thấy khả năng phân giải vi khuẩn kí chủ bởi thực khuẩn thể B80E7 phụ thuộc vào lượng thực khuẩn thể bổ sung và mật số vi khuẩn ban đầu, thời gian tiếp xúc và nhiệt độ. Ở nhiệt độ $7 \pm 1^\circ\text{C}$ thì hiệu quả phân giải vi khuẩn của thực khuẩn thể B80E7 tốt hơn ở 37°C và thời gian phân giải vi khuẩn có tác dụng tốt nhất sau

2 giờ tiếp xúc. Nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng của thực khuẩn thể để tiêu diệt vi khuẩn kháng thuốc và gây bệnh trong chuỗi nuôi trồng và chế biến cá Tra.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này nằm trong khuôn khổ của đề tài A-16 được tài trợ bởi dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn các nhà máy cho phép lấy mẫu và hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

Nghiên cứu này không tồn tại mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] N. Chanishvili, "Phage therapy - history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches," *Advances in Virus Research*, Elsevier, 2012, pp. 3-40.
- [2] S. M. Sillankorva, H. Oliveira, and J. Azeredo, "Bacteriophages and their role in food safety," *International Journal of Microbiology*, vol. 2012, pp. 1-13, 2012.
- [3] M. Połaska and B. Sokołowska, "Bacteriophages - a new hope or a huge problem in the food industry," *Aims Microbiology*, vol. 5, no. 4, pp. 324-346, 2019.
- [4] M. Kazi and U. S. Annapure, "Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens," *Journal of Food Science Technology*, vol. 53, no. 3, pp. 1355-1362, 2016.
- [5] B. F. Gilmore, "Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges," *Expert Review of Anti-Infective therapy*, vol. 10, no. 5, pp. 533-535, 2012.
- [6] L. Fernández, D. Gutiérrez, A. Rodríguez, and P. García, "Application of bacteriophages in the agro-food sector: a long way toward approval," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 8, no. 296, pp. 1-5, 2018.
- [7] Z. D. Moye, J. Woolston, and A. Sulakvelidze, "Bacteriophage applications for food production and processing," *Viruses*, vol. 10, no. 205, pp. 1-22, 2018.
- [8] T. Bigwood, J. A. Hudson, and C. Billington, "Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 291, no. 2009, pp. 59-64, 2009.
- [9] G. O'Flynn, R. Ross, G. Fitzgerald, and A. Coffey, "Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 6, pp. 3417-3424, 2004.
- [10] T. Bigwood, J. Hudson, C. Billington, G. Carey-Smith, and J. Heinemann, "Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat," *Food Microbiology*, vol. 25, no. 2, pp. 400-406, 2008.
- [11] S. Guenther, O. Herzig, L. Fieseler, J. Klumpp, and M. J. Loessner, "Biocontrol of *Salmonella Typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 154, no. 1-2, pp. 66-72, 2012.
- [12] K. A. Soni, R. Nannapaneni, and S. Hagens, "Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 7, no. 4, pp. 427-434, 2010.
- [13] Y. -Y. Liu, Y. Wang, T. R. Walsh, L. -X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, and X. Huang, "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 16, no. 2, pp. 161-168, 2016.
- [15] W. Jansomboon, S. K. Boontanon, N. Boontanon, C. Polprasert, and W. Liamlaem, "Food safety management of imported fishery products in Thailand: antibiotic standards and case study of enrofloxacin contamination in imported *Pangasius* catfish," *International Food Research Journal*, vol. 25, no. 5, pp. 2081-2089, 2018.
- [16] T. T. H. Van, J. Chin, T. Chapman, L. T. Tran, and P. J. Coloe, "Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 124, no. 3, pp. 217-223, 2008.
- [17] R. Boss, G. Overesch, and A. Baumgartner, "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* from raw fish and seafood imported into Switzerland," *Journal of Food Protection*, vol. 79, no. 7, pp. 1240-1246, 2016.
- [18] N. V. Long and D. T. Lua, "Antimicrobial usage and Antimicrobial resistance in Vietnam," Aquatic AMR Workshop 1, 10–11 April 2017, Mangalore, India, 2017.

- [19] D. T. A. Nguyen, M. Kanki, P. Do Nguyen, H. T. Le, P. T. Ngo, D. N. M. Tran, N. H. Le, C. Van Dang, T. Kawai, and R. Kawahara, "Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC β -lactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 236, pp. 115-122, 2016.
- [20] S. Sarter, H. N. K. Nguyen, L. T. Hung, J. Lazard, and D. Montet, "Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish," *Food Control*, vol. 18, no. 11, pp. 1391-1396, 2007.
- [21] D. Salako, P. Trang, N. Ha, T. Miyamoto, and T. Ngoc, "Prevalence of antibiotics resistance *Escherichia coli* collected from *Pangasius* catfish (*Pangasius hypophthalmus*) fillets during processing at two factories in Mekong Delta Vietnam," *Food Research*, vol. 4, no. 5, pp. 1785-1793, 2020.
- [22] T. A. N. Tong, L. Jacxsens, B. Nosedá, S. Samapundo, N. B. Ly, M. Heyndrickx, and F. Devlieghere, "Evaluation of the microbiological safety and quality of Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* during processing by a microbial assessment scheme in combination with a self-assessment questionnaire," *Fisheries Science*, vol. 80, no. 5, pp. 1117-1128, 2014.
- [23] N. T. A. Tong, "Assessment of antibiotic resistance and bacterial contamination of ice sold in Can Tho city, Vietnam," *Vietnam Journal of Science Technology*, vol. 57, no. 3B, pp. 49-58, 2019.
- [24] A. M. Kropinski, A. Mazzocco, T. E. Waddell, E. Lingohr, and R. P. Johnson, *Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay*, Bacteriophages. Springer, 2009, pp. 69-76.
- [25] T. A. Nguyen, V. K. Pham, V. M. P. Nguyen, and T. T. N. Nguyen, "Isolating and screening promising bacteriophages in biological control of bacterial wilt on marigold (*Tagetes papula* L.) caused by *Ralstonia solanacearum* Smith (In Vietnamese)," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 49, pp. 44-52, 2017.
- [26] ISO, "Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (ISO 6887-2:2003)," 2003. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/29866.html>. [Accessed July 15, 2020].
- [27] A. Jurczak-Kurek, T. Gąsior, B. Nejman-Faleńczyk, S. Bloch, A. Dydecka, G. Topka, A. Necel, M. Jakubowska-Deredas, M. Narajczyk, and M. Richert, "Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 1-17, 2016.
- [28] S. T. Abedon, "Phage evolution and ecology," *Advances in Applied Microbiology*, vol. 67, no. 1, pp. 1-45, 2009.
- [29] V. Merriam, "Stability of the carrier state in bacteriophage M13-infected cells," *Journal of Virology*, vol. 21, no. 3, pp. 880-888, 1977.
- [30] R. Buchanan, R. Whiting, and W. Damert, "When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves," *Food Microbiology*, vol. 14, no. 4, pp. 313-326, 1997.
- [31] C. Carvalho, A. R. Costa, F. Silva, and A. Oliveira, "Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 43, no. 5, pp. 583-601, 2017.
- [32] M. H. Chatain-Ly, "The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, no. 51, pp. 1-7, 2014.
- [33] N. E. Galarce, J. L. Bravo, J. P. Robeson, and C. F. Borie, "Bacteriophage cocktail reduces *Salmonella enterica* serovar Enteritidis counts in raw and smoked salmon tissues," *Revista Argentina de Microbiologia*, vol. 46, no. 4, pp. 333-337, 2014.
- [34] H. M. Hungaro, R. C. S. Mendonça, D. M. Gouvêa, M. C. D. Vanetti, and C. L. de Oliveira Pinto, "Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents," *Food Research International*, vol. 52, no. 1, pp. 75-81, 2013.
- [35] B. Guttman, R. Raya, and E. Kutter, *Basic Phage Biology*. In: Kutter E. and Sulakvelidze A. (Eds.), Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press USA, 2005.
- [36] L. G. Harris, S. Foster, and R. G. Richards, "An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review," *ECM Journal (Eur Cell Mater)*, vol. 4, no. 3, pp. 100-120, 2002.
- [37] I. Titzte, T. Lehnher, L. H., and V. Krömker, "Efficacy of bacteriophages against *Staphylococcus aureus* isolates from *Bovine mastitis*," *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 13, no. 3, pp. 35, 2020.