

EVALUATION OF LYTIC ACTIVITY OF BACTERIOPHAGES IN DIFFERENT CONDITIONS AGAINST MULTI-ANTIBIOTIC RESISTANCE *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM *PANGASIVUS HYPOPHthalmus* PRODUCTION CHAIN

Tong Thi Anh Ngoc, Tran Thi Mong Cam, Pham Kim Duyen

Tran Tram Anh, Nguyen Cam Tu, Nguyen Thi Thu Nga*

Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 03/6/2022</p> <p>Revised: 04/11/2022</p> <p>Published: 23/11/2022</p>	<p>This study was conducted to evaluate the lytic activity of bacteriophages (phage N9 and B80) against multi-antibiotic resistance <i>Escherichia coli</i> isolated from <i>Pangasius</i> production chain were tested on simulated media of filleted <i>Pangasius</i> and chicken extracts at different MOI (100-1000) and incubated at $4\pm 1^\circ\text{C}$. The results showed that lytic activity of both phage N9 (MOI 1000) and B80 (MOI 100) against their bacterial hosts were achieved during from 1 to 24 h exposure, specially <i>E. coli</i> count were $<1 \log \text{CFU/mL}$ after 24 h treatment on simulated media of the food extracts incubated at $4\pm 1^\circ\text{C}$. Therefore, this study indicated that bacteriophages were potential agents as biocontrol agents for controlling antibiotic resistant <i>E. coli</i> as well as other pathogens in food production chain.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Bacteriophage</p> <p>Chicken extract</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p>Multi-antibiotic resistance</p> <p><i>Pangasius</i> extract</p>	

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CỦA THỰC KHUẨN THỂ TRONG CÁC ĐIỀU KIỆN KHÁC NHAU ĐỐI VỚI VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* ĐA KHÁNG THUỐC PHÂN LẬP TỪ CHUỖI SẢN XUẤT CÁ TRA

Tổng Thị Ánh Ngọc, Trần Thị Mộng Cẩm, Phạm Kim Duyên

Trần Trâm Anh, Nguyễn Cẩm Tú, Nguyễn Thị Thu Nga*

Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 03/6/2022</p> <p>Ngày hoàn thiện: 04/11/2022</p> <p>Ngày đăng: 23/11/2022</p>	<p>Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng phân giải của hai dòng thực khuẩn thể N9 và B80 đối với các chủng vi khuẩn <i>Escherichia coli</i> đa kháng thuốc được phân lập từ chuỗi sản xuất cá Tra. Nghiên cứu được tiến hành trong hai loại môi trường mô phỏng thực phẩm từ dịch trích thịt cá Tra và thịt ức gà phi lê được bổ sung thực khuẩn thể có hệ số bội nhiễm - MOI khác nhau (từ 100 đến 1000) và ủ ở nhiệt độ $4\pm 1^\circ\text{C}$. Kết quả nghiên cứu cho thấy, thực khuẩn thể N9 (MOI 1000) và B80 (MOI 100) cho thấy hiệu quả phân giải vi khuẩn kí chủ tốt được duy trì từ 1 đến 24 giờ trong các môi trường mô phỏng thực phẩm, cụ thể mật số vi khuẩn <i>E. coli</i> $<1 \log \text{CFU/mL}$ sau 1-24 giờ tiếp xúc với thực khuẩn thể ở nhiệt độ $4\pm 1^\circ\text{C}$. Do đó, nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng thực khuẩn thể để kiểm soát vi khuẩn <i>E. coli</i> đa kháng thuốc cũng như các vi khuẩn gây bệnh khác trong chuỗi sản xuất thực phẩm.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Dịch trích cá Tra</p> <p>Dịch trích gà</p> <p>Đa kháng thuốc</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p>Thực khuẩn thể</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6107>

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

1. Mở đầu

Trong lĩnh vực an toàn và vệ sinh thực phẩm hiện nay, mặc dù đã có rất nhiều tiến bộ, tuy nhiên các bệnh truyền qua thực phẩm (nhiễm trùng và ngộ độc thực phẩm) vẫn xảy ra phổ biến trên toàn thế giới [1], [2]. Havelaar và cộng sự (2015) [3] đã đề cập có khoảng 600 triệu ca nhiễm trùng thực phẩm (năm 2010), với khoảng 420.000 ca tử vong; trong đó, *E. coli* là một trong những vi khuẩn gây bệnh nhiễm trùng thực phẩm phổ biến với khoảng 111 triệu ca nhiễm (chiếm 18,5%) và 63.000 ca tử vong (chiếm 15%). Bên cạnh đó, tình trạng vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh hiện nay ngày càng trở nên phổ biến với các cơ chế kháng thuốc phức tạp dẫn đến hệ quả là việc điều trị bệnh bằng thuốc kháng sinh không còn hiệu quả, do đó làm tăng nguy cơ tử vong của người bệnh, điều này gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới [4], [5]. Mặt khác, dư lượng kháng sinh và các vi khuẩn kháng thuốc đã được báo cáo là có mặt trong các sản phẩm từ cá và trong nước của ao nuôi cá [5]-[10]. Đáng chú ý là, vi khuẩn *E. coli* cũng có khả năng truyền gen kháng thuốc kháng sinh trong cộng đồng vi khuẩn [11]. Hơn nữa, Salako và cộng sự (2020) [6] đã cho thấy có khoảng 50% số khuẩn lạc của vi khuẩn *E. coli* được phân lập từ quy trình chế biến cá Tra phi lê đông lạnh là đa kháng thuốc (đề kháng với từ ba loại kháng sinh trở lên).

Trước tình hình vi khuẩn kháng thuốc ngày càng phổ biến, thực khuẩn thể (bacteriophage hoặc phage) được xem là một liệu pháp tiềm năng để thay thế cho thuốc kháng sinh trong việc kiểm soát các vi khuẩn gây bệnh và/hoặc (đa) kháng thuốc [1], [12]. Thực khuẩn thể là những virus kí sinh trên một hoặc một số loài hoặc chủng vi khuẩn nhất định, do đó thực khuẩn thể có tính đặc hiệu cao [13]. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy tiềm năng ứng dụng của thực khuẩn thể trong việc kiểm soát các vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm như: *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp. và *Salmonella* spp. [1], [14]-[16]. Thực khuẩn thể cũng có thể được ứng dụng trong ngăn ngừa nhiễm khuẩn trên nhiều loại nguyên liệu thực phẩm khác nhau, chẳng hạn như: thịt, thủy sản, sữa và các loại rau quả [17]. Liu và cộng sự (2015) [18] sử dụng bốn dòng thực khuẩn thể (T5, T1, T4 và O1) dưới dạng đơn lẻ hoặc kết hợp đã làm giảm đáng kể lượng *E. coli* O157 trên thịt bò ở tất cả các MOI (10 và 1000) và nhiệt độ khảo sát (4, 22 và 37°C). Mặt khác, thực khuẩn thể giúp kiểm hãm sự phát triển của vi khuẩn *S. aureus* của sữa nguyên liệu trong quá trình làm chín của phô mai Romanian [19]. Thực khuẩn thể A511 cũng đã được ứng dụng để tiêu diệt vi khuẩn *L. monocytogenes* trong các loại phô mai [20]. Tương tự, hai dòng thực khuẩn thể P100 và A511 cũng đã được nghiên cứu để kiểm soát vi khuẩn *L. monocytogenes* trong các sản phẩm thực phẩm khác nhau như: xúc xích, thịt gà và cá [21]. Abuladze và cộng sự (2008) [22] khi sử dụng ba thực khuẩn thể độc lực thuộc họ *Myoviridae* đã làm giảm 94-100% lượng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 trên cà chua và rau bina. Trong những năm gần đây, các liệu pháp thực khuẩn thể đã được tiếp tục nghiên cứu phát triển trong lĩnh vực bảo quản thực phẩm [23]-[27]. Hiện nay, các sản phẩm thương mại của thực khuẩn thể cũng đã có mặt trên thị trường và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như: y tế, môi trường, trồng trọt, chăn nuôi, thực phẩm hay chất khử trùng dùng trong công nghiệp chế biến thực phẩm [1], [14], [28], [29]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định khả năng phân giải của thực khuẩn thể trong các điều kiện khác nhau trên vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc, từ đó nghiên cứu ứng dụng thực khuẩn thể trên thực phẩm để kiểm soát các vi khuẩn gây bệnh và/hoặc kháng thuốc trong chuỗi sản xuất thực phẩm.

2. Phương tiện và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng

Nghiên cứu này khảo sát khả năng phân giải của hai dòng thực khuẩn thể 9ER3 (N9) và B80E7 (B80) trên vi khuẩn kí chủ *E. coli* đa kháng thuốc trên môi trường mô phỏng thực phẩm, cụ thể là môi trường dịch trích từ thịt cá Tra và thịt ức gà phi lê.

Dòng thực khuẩn thể N9 có kí chủ là chủng vi khuẩn *E. coli* 9ER được phân lập từ mẫu ruột cá Tra nuôi và đề kháng 15 loại kháng sinh lần lượt là: ampicillin 10 µg, meropenem 10 µg, gentamicin 10 µg, tetracycline 30 µg, chloramphenicol 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, fosfomycin 200 µg, ceftazidime 30 µg, cefotaxime 30 µg, ceftioxitin 30 µg, kanamycin 30 µg, streptomycin 10 µg, sulfamethoxazole/trimethoprim 23,75/1,25 µg, nalidixic acid 30 µg và colistin 10 µg.

Dòng thực khuẩn thể B80 có kí chủ là chủng vi khuẩn *E. coli* 80E được phân lập từ mẫu cá Tra chính hình trong quy trình chế biến cá Tra phi lê đông lạnh và đề kháng với bốn loại kháng sinh lần lượt là: ampicillin 10 µg, chloramphenicol 30 µg, ciprofloxacin 5 µg và nalidixic acid 30 µg.

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

Thực khuẩn thể N9 và B80 được phân lập theo phương pháp đổ đĩa bằng môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Đức) có bổ sung 0,8% agar (thạch TSB 0,8% và agar, HiMedia, Ấn Độ) [30]. Các dòng thực khuẩn thể sau khi tách rỗng có sự đồng đều về hình thái vết tan (plaque) được bảo quản tối trong nước cất ở 4°C để sử dụng trong nghiên cứu.

Chuẩn bị các môi trường mô phỏng thực phẩm dạng lỏng: cá Tra nguyên con còn sống được thu mua từ một tiểu thương tại thành phố Cần Thơ và thịt ức gà phi lê được mua từ một siêu thị, sau đó tiến hành trích cá Tra và ức gà theo quy trình của Nosedá và cộng sự (2010) [31].

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1. Chuẩn bị mẫu thí nghiệm

Khuẩn lạc rời của vi khuẩn kí chủ (*E. coli* 9ER và *E. coli* 80E) trên thạch Tryptic Soy Agar (TSA, Merck, Đức) được tăng sinh trong môi trường TSB trong 18-24 giờ ở 37°C. Sau đó, huyền phù vi khuẩn được chuẩn độ đục với McFarland 0,5 để có được nồng độ vi khuẩn tương đương 10^8 CFU/mL. Thực khuẩn thể N9 và B80 sau đó được cấy truyền trên thạch TSB 0,8% có hoà sẵn 0,1 mL vi khuẩn kí chủ (10^8 CFU/mL) để nhân mật số trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Mật số thực khuẩn thể (PFU/mL) được xác định bằng phương pháp đổ đĩa với 10-12 mL thạch TSB 0,8% có hoà sẵn vi khuẩn kí chủ và ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Thực khuẩn thể N9 và B80 và vi khuẩn kí chủ của chúng (*E. coli* 9ER và *E. coli* 80E) được bổ sung vào các ống nghiệm chứa 10 mL các môi trường mô phỏng thực phẩm sao cho mật số ban đầu của vi khuẩn kí chủ là 10^3 CFU/mL và hệ số bội nhiễm - MOI (tỉ lệ giữa lượng thực khuẩn thể và vi khuẩn) từ 100 đến 1000, với mẫu đối chứng là mẫu không bổ sung thực khuẩn thể. Sau đó, mẫu được ủ ở nhiệt độ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 24 giờ. Mật số vi khuẩn còn sống sót tại các thời điểm giữa 0 đến 24 giờ được xác định để đánh giá khả năng phân giải của thực khuẩn thể. Thí nghiệm được lặp lại hai lần độc lập.

2.3. Xử lý số liệu

Kết quả của tất cả các lần lặp lại được tính toán ở dạng trung bình logarit của số khuẩn lạc hoặc vết tan hình thành, tức là log CFU/mL (đối với vi khuẩn) hoặc log PFU/mL (đối với thực khuẩn thể). Số liệu được tính toán bằng chương trình Microsoft Excel 2019 và được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm của mẫu nghiên cứu

Các đặc điểm về nguồn gốc, kí chủ, hình thái vết tan và mật số của hai dòng thực khuẩn thể N9 và B80 được mô tả ở bảng 1.

Qua bảng 1 cho thấy, hai dòng thực khuẩn thể N9 và B80 có nguồn gốc phân lập khác nhau (nước và bùn đáy ao nuôi cá Tra) và vi khuẩn kí chủ khác nhau (nguồn gốc phân lập và tính

kháng thuốc) thì cũng khác nhau về các đặc điểm của hình thái vết tan cũng như mật số của thực khuẩn thể. Cụ thể, thực khuẩn thể N9 với kiểu hình thái vết tan có tâm trong và quầng ngoài mờ, đường kính vết tan là $7,8 \pm 0,8$ mm; trong khi thực khuẩn thể B80 với vết tan có tâm trong nhưng viền ngoài mờ, đường kính vết tan là $2,4 \pm 0,4$ mm (bảng 1). Đường kính vết tan lớn hơn có thể cho thấy khả năng nhân mật số cao hơn. Mật số của dòng thực khuẩn thể N9 (sau tăng sinh trên thạch TSB 0,8% ủ ở 37°C trong 24 giờ) cao hơn $0,7$ log PFU/mL so với dòng thực khuẩn thể B80 (Bảng 1). Khi tế bào vi khuẩn bị phá vỡ có thể giải phóng từ 100 đến 200 thực khuẩn thể mới (virion) vào môi trường xung quanh sau mỗi chu trình tan (khoảng 20-30 phút ở 37°C) và chúng có thể lặp lại chu trình tan mới [32]. Mặt khác, các thực khuẩn thể có đầu lớn hơn (họ *Myoviridae*) có xu hướng hình thành các vết tan nhỏ hơn so với các thực khuẩn thể có đầu nhỏ hơn (họ *Siphoviridae* và *Podoviridae*). Điều này được lý giải là do các virion có đầu lớn hơn sẽ khuếch tán chậm hơn qua lớp thạch nuôi cấy so với các virion có đầu nhỏ hơn, do đó tạo ra các vết tan nhỏ hơn [33], [34].

Bảng 1. Đặc điểm của thực khuẩn thể N9 và B80

Đặc điểm	Thực khuẩn thể N9	Thực khuẩn thể B80
Nguồn gốc	Mẫu nước từ ao nuôi cá Tra	Mẫu bùn đáy từ ao nuôi cá Tra
Kí chủ	Chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> 9ER được phân lập từ mẫu ruột cá Tra nuôi và đề kháng với 15 loại kháng sinh	Chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> 80E được phân lập từ mẫu cá Tra chính hình và đề kháng với 4 loại kháng sinh
Hình thái vết tan	Có tâm trong và quầng ngoài mờ; đường kính vết tan $7,8 \pm 0,8$ mm	Có tâm trong và viền ngoài mờ; đường kính vết tan $2,4 \pm 0,4$ mm
Mật số thực khuẩn thể	$9,2 \pm 0,4$ log PFU/mL	$8,5 \pm 0,1$ log PFU/mL

Kiểu hình thái vết tan có tâm trong, viền ngoài mờ có thể do sự ức chế phân giải bởi sự khuếch tán và hoạt động của enzyme lipo-polysaccharide depolymerase được sinh ra bởi thực khuẩn thể, có tác dụng phân hủy màng lipopolysaccharide của vi khuẩn tạo vết tan có quầng hoặc viền mờ xung quanh hoặc do khả năng phân giải bị giảm bởi sự lão hoá của vi khuẩn [30], [34], [35]. Mặt khác, sự hình thành các vết tan trong (clear plaque) của thực khuẩn thể điển hình cho các thực khuẩn thể độc (lytic/virulent phage) như trong kết quả của nghiên cứu này, trong khi đó sự hình thành các vết tan đục (turbid plaque) có thể là các thực khuẩn thể ôn hoà (temperate phage) [34]. Hình thái vết tan của hai dòng thực khuẩn thể N9 và B80 trong nghiên cứu này tương đồng với hai trong bốn kiểu hình thái vết tan của thực khuẩn thể được đề cập trong nghiên cứu của Jurczak-Kurek và cộng sự (2016) [34]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Trọng Ngữ và cộng sự (2020) [36] trên các thực khuẩn thể có nguồn gốc từ các mẫu đất bề mặt của các trang trại nuôi gà ở Đồng bằng sông Cửu Long và gây nhiễm trên vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên gà cũng tìm thấy được có một trong bốn hình thái vết tan tương tự như trong kết quả của nghiên cứu này.

3.2. Khả năng phân giải của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn kí chủ trong các môi trường mô phỏng thực phẩm dạng lỏng

3.2.1. Khả năng phân giải của thực khuẩn thể N9 và B80 trong môi trường dịch trích từ thịt cá Tra phi lê

Mật số vi khuẩn kí chủ theo thời gian khi xử lý với thực khuẩn thể N9 và B80 trong môi trường dịch trích cá Tra ở nhiệt độ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ được thể hiện ở bảng 2 và 3 (minh họa ở hình 1 và hình 2). Kết quả ở bảng 2 cho thấy, việc bổ sung thực khuẩn thể N9 (MOI 1000) đã làm giảm mật số vi khuẩn *E. coli* 9ER từ $3,3 \pm 0,1$ ở thời điểm 0 giờ xuống còn <1 log CFU/mL sau 1 đến 24 giờ tiếp xúc và thấp hơn ý nghĩa so với mẫu đối chứng không bổ sung thực khuẩn thể ($p < 0,05$). Tương tự, kết quả ở bảng 3 cũng cho thấy ở nhiệt độ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ thì thực khuẩn thể B80 (MOI 100) đã làm giảm ý nghĩa mật số vi khuẩn *E. coli* 80E (<1 log CFU/mL sau 1 đến 24 giờ tiếp xúc) so với

mẫu đối chứng ($p < 0,05$). Mặt khác, ở mẫu đối chứng thì mật số vi khuẩn *E. coli* ổn định trong thời gian khảo sát từ 0 đến 24 giờ (bảng 2 và bảng 3) do vi khuẩn *E. coli* không phát triển ở nhiệt độ 4°C [37]. Bên cạnh đó, nhiệt độ thấp ($0-4^{\circ}\text{C}$) là nhiệt độ được khuyến cáo áp dụng trong bảo quản các loại thực phẩm tươi sống như thịt và cá [38]. Vì vậy, hiệu quả phân giải tốt của hai dòng thực khuẩn thể N9 và B80 đối với vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc ở nhiệt độ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ có khả năng ứng dụng trong thực tế. Bên cạnh đó, thực khuẩn thể cũng được ứng dụng như chất khử trùng sinh học để tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh và/hoặc màng sinh học (biofilm) trong công nghiệp thực phẩm [14], [39].

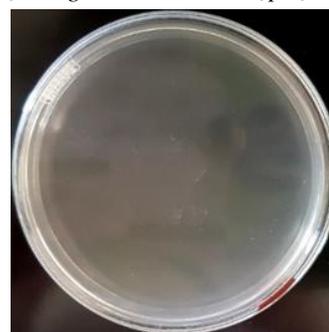
Bảng 2. Mật số vi khuẩn *E. coli* 9ER theo thời gian tiếp xúc với thực khuẩn thể N9 trong môi trường dịch trích cá Tra

Thời gian ủ (giờ)	Mật số vi khuẩn <i>E. coli</i> 9ER (log CFU/mL)	
	Đối chứng	MOI 1000
0	3,3±0,1	2,6±0,1
1	3,0±0,4	<1,0
2	3,1±0,3	<1,0
3	3,1±0,3	<1,0
4	3,1±0,3	<1,0
5	3,1±0,3	<1,0
6	3,2±0,3	<1,0
8	3,1±0,2	<1,0
24	3,0±0,3	<1,0

Chú thích: Đối chứng là mẫu không có bổ sung thực khuẩn thể; MOI 1000 là mẫu có bổ sung thực khuẩn thể với hệ số bội nhiễm bằng 1000. Kết quả trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.



Mẫu đối chứng ở nồng độ đồ đĩa 10^{-1} sau 24 giờ ủ ở $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$



Mẫu MOI 1000 ở nồng độ đồ đĩa 10^0 sau 24 giờ ủ ở $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Hình 1. Minh họa hiệu quả phân giải của thực khuẩn thể N9 đối với vi khuẩn *E. coli* 9ER trong môi trường dịch trích cá Tra

Bảng 3. Mật số vi khuẩn *E. coli* 80E theo thời gian tiếp xúc với thực khuẩn thể B80 trong môi trường dịch trích cá Tra

Thời gian ủ (giờ)	Mật số vi khuẩn <i>E. coli</i> 80E (log CFU/mL)	
	Đối chứng	MOI 100
0	3,3±0,0	2,2±0,1
1	3,2±0,1	<1,0
2	3,2±0,1	<1,0
3	3,3±0,0	<1,0
4	3,2±0,1	<1,0
5	3,3±0,2	<1,0
6	3,3±0,1	<1,0
8	3,2±0,1	<1,0
24	3,3±0,2	<1,0

Chú thích: Đối chứng là mẫu không có bổ sung thực khuẩn thể; MOI 100 là mẫu có bổ sung thực khuẩn thể với hệ số bội nhiễm bằng 100. Kết quả trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.



Mẫu đối chứng ở nồng độ đồ đĩa 10^{-1}
sau 24 giờ ủ ở $4\pm 1^\circ\text{C}$



Mẫu MOI 100 ở nồng độ đồ đĩa 10^0
sau 24 giờ ủ ở $4\pm 1^\circ\text{C}$

Hình 2. Minh họa hiệu quả phân giải của thực khuẩn thể B80 đối với vi khuẩn *E. coli* 80E trong môi trường dịch trích cá Tra

3.2.2. Khả năng phân giải của thực khuẩn thể N9 và B80 trong môi trường dịch trích từ thịt ức gà phi lê

Khả năng phân giải vi khuẩn kí chủ của thực khuẩn thể N9 và B80 trong môi trường dịch trích gà ở nhiệt độ $4\pm 1^\circ\text{C}$ được thể hiện ở bảng 4 và bảng 5 (minh họa ở hình 3 và hình 4). Tương tự trong môi trường dịch trích cá Tra, trong môi trường dịch trích gà thì việc sử dụng thực khuẩn thể N9 và B80 (MOI lần lượt là 1000 và 100) đã làm giảm ý nghĩa mật số của vi khuẩn kí chủ so với mẫu đối chứng ở nhiệt độ $4\pm 1^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). Cụ thể, mật số vi khuẩn *E. coli* duy trì < 1 log CFU/mL trong thời gian sau 1 đến 24 giờ tiếp xúc. Như đã đề cập, thực khuẩn thể phụ thuộc vào sự phát triển của kí chủ để nhân lên, do đó hiệu quả phân giải kí chủ của thực khuẩn thể có thể đạt được trong các môi trường nuôi cấy kí chủ không có chứa các chất ức chế (urea, alcohol, aldehyde, peroxide, chlorine...) hoặc các điều kiện gây bất lợi khác cho thực khuẩn thể (tia UV, nhiệt độ, pH...) [40], [41]. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn kí chủ trong nghiên cứu này có khả năng phát triển tốt trong hai loại môi trường thử nghiệm tại nhiệt độ tối ưu; cụ thể, mật số vi khuẩn đạt $8,9\pm 0,1$ log CFU/mL sau 24 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C trong hai môi trường dịch trích cá Tra và gà (số liệu không trình bày). Tóm lại, hiệu quả phân giải vi khuẩn kí chủ của hai dòng thực khuẩn thể N9 và B80 trong nghiên cứu này tương tự nhau trong môi trường dịch trích từ thịt cá Tra và ức gà phi lê.

Bảng 4. Mật số vi khuẩn *E. coli* 9ER theo thời gian tiếp xúc với thực khuẩn thể N9 trong môi trường dịch trích gà

Thời gian ủ (giờ)	Mật số vi khuẩn <i>E. coli</i> 9ER (log CFU/mL)	
	Đối chứng	MOI 1000
0	3,3±0,01	2,2±0,02
1	3,2±0,05	<1,0
2	3,2±0,05	<1,0
3	3,1±0,04	<1,0
4	3,2±0,03	<1,0
5	3,2±0,03	<1,0
6	3,2±0,01	<1,0
8	3,1±0,01	<1,0
24	3,3±0,01	<1,0

Chú thích: Đối chứng là mẫu không có bổ sung thực khuẩn thể; MOI 1000 là mẫu có bổ sung thực khuẩn thể với hệ số bội nhiễm bằng 1000. Kết quả trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Các kết quả trong nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu của Islam và cộng sự (2019) [42] khi sử dụng hỗn hợp gồm ba thực khuẩn thể (LPSTLL, LPST94 và LPST153) để kiểm soát vi khuẩn *S. typhimurium* trong sữa. Kết quả cho thấy, mật số *S. typhimurium* đã giảm xuống < 1 CFU/100 μL sau 3-6 giờ tiếp xúc với thực khuẩn thể ở nhiệt độ 4°C (MOI 1000).

Nghiên cứu khác của Hoàng Minh Đức và cộng sự (2018) [43] cũng cho thấy khi sử dụng thực khuẩn thể để kiểm soát vi khuẩn *Salmonella* trên thịt gà ở nhiệt độ 8°C thì mật số vi khuẩn *Salmonella* (*S. enteritidis* và *S. typhimurium*) trong mẫu không bổ sung thực khuẩn thể ổn định trong suốt thời gian ủ. Thay vào đó, mật số vi khuẩn *Salmonella* đã giảm xuống 1,2-1,4 log CFU/g sau 2 giờ tiếp xúc trong các mẫu được xử lý với thực khuẩn thể.



Mẫu đối chứng ở nồng độ đổ đĩa 10^{-1}
sau 24 giờ ủ ở $4\pm 1^\circ\text{C}$



Mẫu MOI 1000 ở nồng độ đổ đĩa 10^0
sau 24 giờ ủ ở $4\pm 1^\circ\text{C}$

Hình 3. Minh họa hiệu quả phân giải của thực khuẩn thể N9 đối với vi khuẩn *E. coli* 9ER trong môi trường dịch trích gà

Bảng 5. Mật số vi khuẩn *E. coli* 80E theo thời gian tiếp xúc với thực khuẩn thể B80 trong môi trường dịch trích gà

Thời gian ủ (giờ)	Mật số vi khuẩn <i>E. coli</i> 80E (log CFU/mL)	
	Đối chứng	MOI 100
0	3,3±0,12	2,2±0,04
1	3,2±0,13	<1,0
2	3,1±0,08	<1,0
3	3,2±0,00	<1,0
4	3,2±0,02	<1,0
5	3,2±0,02	<1,0
6	3,2±0,12	<1,0
8	3,1±0,09	<1,0
24	3,2±0,06	<1,0

Chú thích: Đối chứng là mẫu không có bổ sung thực khuẩn thể; MOI 100 là mẫu có bổ sung thực khuẩn thể với hệ số bội nhiễm bằng 100. Kết quả trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.



Mẫu đối chứng ở nồng độ đổ đĩa 10^{-1}
sau 24 giờ ủ ở $4\pm 1^\circ\text{C}$



Mẫu MOI 100 ở nồng độ đổ đĩa 10^0
sau 24 giờ ủ ở $4\pm 1^\circ\text{C}$

Hình 4. Minh họa hiệu quả phân giải của thực khuẩn thể B80 đối với vi khuẩn *E. coli* 80E trong môi trường dịch trích gà

Ngược lại, nghiên cứu của Hoàng Minh Sơn và cộng sự (2018) [44] cho thấy khả năng phân giải vi khuẩn *E. coli* O157:H7 tốt hơn khi hỗn hợp thực khuẩn thể - kí chủ được ủ ở nhiệt độ 25°C so với nhiệt độ 8°C (sự giảm mật số vi khuẩn đạt được lớn hơn ở 25°C). Điều này có thể

được giải thích là do thực khuẩn thể phụ thuộc vào sự phát triển của vi khuẩn kí chủ để nhân lên, ở nhiệt độ thấp thì sự tăng trưởng của vi khuẩn kí chủ giảm hoặc dừng lại dẫn đến sự tăng trưởng của thực khuẩn thể cũng giảm đáng kể hoặc dừng lại [45], [46]. Mặt khác, trong nghiên cứu của O'Flynn và cộng sự (2004) [47], thực khuẩn thể e11/2 và e4/1c đã được sử dụng để tiêu diệt vi khuẩn *E. coli* O157:H7 trên bề mặt thịt bò ở các nhiệt độ 12, 30 và 37°C. Kết quả cho thấy, cả hai thực khuẩn thể đã làm giảm 3 đơn vị log mật số vi khuẩn *E. coli* O157:H7 ở 30 và 37°C, và 5 đơn vị log mật số vi khuẩn ở 12°C (sau 2 giờ tiếp xúc). Qua các kết quả nghiên cứu này đã cho thấy tiềm năng ứng dụng thực khuẩn thể trong việc kiểm soát vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc trong chuỗi sản xuất thực phẩm như cá Tra, thịt gà, thủy sản... cũng như trong việc kiểm soát các loài vi khuẩn gây bệnh khác trên thực phẩm.

4. Kết luận và đề nghị

Ở nhiệt độ $4\pm 1^\circ\text{C}$, cả hai dòng thực khuẩn thể N9 và B80 đều cho thấy hiệu quả phân giải vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc được duy trì suốt từ 1 đến 24 giờ trong hai môi trường mô phỏng thực phẩm là dịch trích cá Tra và gà. Cụ thể, mật số vi khuẩn *E. coli* giảm xuống < 1 log CFU/mL sau 1-24 giờ tiếp xúc với thực khuẩn thể. Kết quả nghiên cứu này đã cho thấy tiềm năng ứng dụng thực khuẩn thể trong việc kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trên thực phẩm. Nghiên cứu hiệu quả phân giải của hỗn hợp thực khuẩn thể (phage cocktail) trên vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc trên thực phẩm (thịt cá Tra phi lê và thịt ức gà phi lê) được đề nghị trong các nghiên cứu tiếp theo.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Z. D. Moye, J. Woolston, and A. Sulakvelidze, "Bacteriophage applications for food production and processing," *Viruses*, vol. 10, no. 4, p. 205, 2018.
- [2] C. C. Adley and M. P. Ryan, "Chapter 1 - The nature and extent of foodborne disease," in *Antimicrobial food packaging*. Elsevier, pp. 1-10, 2016.
- [3] A. H. Havelaar, M. D. Kirk, P. R. Torgerson, H. J. Gibb, T. Hald, R. J. Lake, N. Praet, D. C. Bellinger, N. R. Silva, and N. Gargouri, "World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010," *PLoS Med*, vol. 12, 2015, Art. no. e1001923.
- [4] 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.
- [5] W. Jansomboon, S. 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.
- [6] D. A. Salako, N. T. Phan, C. H. Nguyen, T. Miyamoto, and T. A. N. Tong, "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.
- [7] 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.
- [8] V. Nguyen and T. Dang, "Antimicrobial usage and Antimicrobial resistance in Vietnam," In *Aquatic AMR Workshop 1*, pp. 10-11. Mangalore, India, 2017.
- [9] S. Sarter, H. N. K. Nguyen, 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.

- [10] D. T. A. Nguyen, M. Kanki, P. D. Nguyen, H. T. Le, P. T. Ngo, D. N. M. Tran, N. H. Le, C. V. 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.
- [11] 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.
- [12] K. E. Kortright, B. K. Chan, J. L. Koff, and P. E. Turner, "Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria," *Cell Host and Microbe*, vol. 25, no. 2, pp. 219-232, 2019.
- [13] L. M. Kasman and L. D. Porter, "Bacteriophages," 2020. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>. [Accessed July 23, 2021].
- [14] 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.
- [15] M. Kazi and U. S. Annature, "Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 53, pp. 1355-1362, 2016.
- [16] L. Ushanov, B. Lasareishvili, I. Janashia, and A. E. Zautner, "Application of *Campylobacter jejuni* phages: challenges and perspectives," *Animals*, vol. 10, no. 2, p. 279, 2020.
- [17] S. Sharma, S. Chatterjee, S. Datta, R. Prasad, D. Dubey, R. K. Prasad, and M. G. Vairale, "Bacteriophages and its applications: An overview," *Folia Microbiologica*, vol. 62, pp. 17-55, 2017.
- [18] H. Liu, Y. Niu, R. Meng, J. Wang, J. Li, R. Jonhson, T. McAllister, and K. Stanford, "Control of *Escherichia coli* O157 on beef at 37, 22 and 4°C by T5-, T10, T4- and O1-like bacteriophages," *Food Microbiology*, vol. 51, pp. 69-73, 2015.
- [19] P. Garcia, M. Dobrea, and D. Georgescu, "Microbial population dynamics in presence of lactococcal bacteriophage during ripening of traditional raw milk Romanian cheese," *Journal of Dairy Science*, vol. 92, pp. 3019-3026, 2009.
- [20] S. Guenther and M. Loessner, "Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses," *Bacteriophage*, vol. 1, pp. 94-100, 2011.
- [21] S. Guenther, D. Huwyler, S. Richard, and M. Loessner, "Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, pp. 93-100, 2009.
- [22] T. Abuladze, M. Li, M. Y. Menetrez, T. Dean, A. Senecal, and A. Sulakvelidze, "Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 20, pp. 6230-6238, 2008.
- [23] I. R. Cooper, "A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 130, pp. 38-47, 2016.
- [24] H. Cui, L. Yuan, and L. Lin, "Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef," *Carbohydrate Polymers*, vol. 177, pp. 156-164, 2017.
- [25] D. M. Gouvêa, R. C. S. Mendonça, M. E. S. Lopez, and L. S. Batalha, "Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 67, pp. 159-166, 2016.
- [26] J. A. Hermoso, J. L. García, and P. García, "Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 10, no. 5, pp. 461-472, 2007.
- [27] A. M. Kropinski, "Bacteriophage research: What we have learnt and what still needs to be addressed," *Research in Microbiology*, vol. 169, no. 9, pp. 481-487, 2018.
- [28] A. G. de Melo, S. Levesque, and S. Moineau, "Phages as friends and enemies in food processing," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 49, pp. 185-190, 2018.
- [29] S. Meaden and B. Koskella, "Exploring the risks of phage application in the environment," *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, p. 358, 2013.
- [30] T. A. N. Tong, C. T. Nguyen, C. H. Nguyen, and T. T. N. Nguyen, "Studying antimicrobial activity of bacteriophages on multi-antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from Tra fish (*Pangasius hypophthalmus*) - In Vietnamese," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 226, no. 5, pp. 147-155, 2021.

- [31] B. Nosedá, J. Dewulf, J. Goethals, P. Ragaert, I. Van Bree, D. Pauwels, H. Van Langenhove, and F. Devlieghere, "Effect of food matrix and pH on the volatilization of bases (TVB) in packed North Atlantic gray shrimp (*Crangon crangon*): volatile bases in MAP fishery products," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 22, pp. 11864-11869, 2010.
- [32] L. D. Nguyen, T. V. H. Bui, D. Q. Nguyen, V. T. Pham, T. H. Pham, V. H. Le, C. T. Chung, and T. H. Le, *Microbiology. Part II: Physiology, biochemistry, genetics, immunology and microbial ecology*. Science and Technology Publishing, 2019, p. 725.
- [33] S. C. Park, I. Shimamura, M. Fukunaga, K. I. Mori, and T. Nakai, "Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 4, pp. 1416-1422, 2000.
- [34] 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.
- [35] M. J. Lai, K. C. Chang, S. W. Huang, C. H. Luo, P. Y. Chiou, C. C. Wu, and N. T. Lin, "The tail associated protein of *Acinetobacter baumannii* phage Φ AB6 is the host specificity determinant possessing exopolysaccharide depolymerase activity," *PloS One*, vol. 11, no. 4, 2016, Art. no. e0153361.
- [36] T. N. Nguyen, T. L. Huynh, T. H. N. Nguyen, K. N. H. Pham, H. A. Luu, and H. X. Nguyen, "Isolation and characterization of bacteriophages against *Escherichia coli* isolates from chicken farms," *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, vol. 8, no. 2, pp. 161-166, 2020.
- [37] D. Conner, "Temperature and NaCl affect growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in poultry-based and laboratory media," *Journal of Food Science*, vol. 57, no. 2, pp. 532-533, 1992.
- [38] S. J. James and C. James, "Chilling and freezing of foods. Second Edition," in *Food Processing: Principles Applications*. Editors: John Wiley & Sons, Ltd., 2014, pp. 79-105.
- [39] D. Gutiérrez, L. Rodríguez-Rubio, B. Martínez, A. Rodríguez, and P. García, "Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 825, 2016.
- [40] B. Guttman, R. Raya, and E. Kutter, "Basic Phage Biology," in *Bacteriophages: Biology and applications*, E. Kutter and Sulakvelidze A., Editors, CRC Press USA, 2005.
- [41] J. Sommer, C. Trautner, A. K. Witte, S. Fister, D. Schoder, P. Rossmanith, and P.-J. Mester, "Don't shut the stable door after the phage has bolted - The importance of bacteriophage inactivation in food environments," *Viruses*, vol. 11, no. 5, p. 468, 2019.
- [42] M. Islam, Y. Zhou, L. Liang, I. Nime, K. Liu, T. Yan, and J. Li, "Application of a phage cocktail for control of *Salmonella* in foods and reducing biofilms," *Viruses*, vol. 11, no. 9, p. 841, 2019.
- [43] M. D. Hoang, M. S. Hoang, K. I. Honjoh, and T. Miyamoto, "Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 91, pp. 353-360, 2018.
- [44] M. S. Hoang, M. D. Hoang, Y. Masuda, K. I. Honjoh, and T. Miyamoto, "Application of bacteriophages in simultaneously controlling *Escherichia coli* O157: H7 and extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 102, no. 23, pp. 10259-10271, 2018.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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.