

SOLATION OF BACTERIA FROM SHRIMP POND BOTTOM SLUDGE WITH THE CAPACITY TO INHIBIT *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis ATCC 49223 AND *Vibrio* spp.

Truong Thi Bich Van*, Nguyen Thi Loan Anh

Institute of Food and Biotechnology - Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 06/11/2023	The study isolated 49 bacteriophage strains across nine host strains by double-layer agar-drop method. Overall, all 49 bacteriophage strains are capable of infecting at least one bacterial host. Bacteriophage (Φ) Pm5 and ΦPm12 are the two phage strains with the widest host spectrum (9/9 and 8/9 bacterial strains respectively), but the small diameter and turbid plaque indicate that the infectiousness of these two phage strains is quite low. ΦVT232 and Φ5A were discovered to be two new bacteriophage strains that have the ability to specifically detoxify <i>S. Enteritidis</i> and <i>S. Typhimurium</i> . However, Φ5A is still known as a bacteriophage with many host organisms including <i>Vibrio</i> and <i>E.coli</i> . Phage VT232 was discovered as an antibiotic replacement therapy in the management of due to its stability in the pH range of 5-10 and temperatures of -20°C to 60°C. Bacteriophage show promise as a potential agent against <i>Salmonella</i> -induced infections in livestock and aquaculture.
Revised: 07/3/2024	
Published: 12/3/2024	
KEYWORDS	
Bacteriophage	
Bacterial host	
Double-layer agar	
<i>Salmonella</i> spp.	
<i>Vibrio</i> spp.	

PHÂN LẬP THỰC KHUẨN THỂ TỪ Bùn Đáy AO NUÔI TÔM CÓ KHẢ NĂNG ỨCHẾ VI KHUẨN *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis ATCC 49223 VÀ *Vibrio* spp.

Trương Thị Bích Vân*, Nguyễn Thị Loan Anh

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm – Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 06/11/2023	Bốn mươi chín dòng thực khuẩn thể (Φ) được phân lập từ nước và bùn đáy ao tôm. Chín dòng vi khuẩn được chọn làm ký chủ để nhận diện thực khuẩn bằng phương pháp agar hai lớp. Thực khuẩn thể (Φ) Pm5 và ΦPm12 là hai dòng thực khuẩn thể có phổ ký chủ rộng nhất với lần lượt là 9/9 và 8/9 dòng vi khuẩn. Thực khuẩn thể ΦVT232 và Φ5A là hai chủng có khả năng ly giải đặc hiệu đối với vi khuẩn <i>Salmonella-enteritidis</i> và <i>Salmonella-typhimurium</i> . Tuy nhiên, TKT Φ5A có khả năng ly giải với nhiều vật chủ bao gồm <i>Vibrio</i> và <i>Escherichia-coli</i> . TKT ΦVT232 hứa hẹn là liệu pháp thay thế kháng sinh trong việc kiểm soát các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn <i>Salmonella</i> gây ra do tính ổn định trong phạm vi pH từ 5-10 và nhiệt độ từ -20°C đến 60°C. Từ kết quả ban đầu cho thấy các dòng thực khuẩn thể mở ra hướng ứng dụng tiềm năng chống lại các nhiễm khuẩn do vi khuẩn <i>Salmonella</i> gây nên trong chăn nuôi và thủy sản.
Ngày hoàn thiện: 07/3/2024	
Ngày đăng: 12/3/2024	
TỪ KHÓA	
Thực khuẩn thể (Φ)	
Phổ ký chủ	
Agar hai lớp	
<i>Salmonella</i> spp.	
<i>Vibrio</i> spp.	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8897>

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

1. Giới thiệu

Một trong những thách thức mà ngành tôm phải đối mặt là tình trạng kháng kháng sinh (AMR) do quá trình điều trị bệnh trong nuôi tôm [1], [2]. Sự ô nhiễm của các sản phẩm thực phẩm nuôi trồng thủy sản với dư lượng kháng sinh thể hiện mối nguy hiểm tiềm ẩn đối với sức khỏe người tiêu dùng do ngộ độc thực phẩm, phát triển các vấn đề dị ứng, thay đổi hệ vi khuẩn đường ruột, cũng như khi sự xuất hiện và lan rộng sau đó của tình trạng kháng kháng sinh [3]. Năm 2021, tôm nhập khẩu vào Mỹ từ nhiều quốc gia châu Á đã bị từ chối do có sự hiện diện của vi khuẩn *Salmonella* spp. [4]. Bên cạnh đó, sự nhiễm nhiều chủng vi khuẩn *Vibrio* khác nhau thường gây ra bệnh Vibriosis ở tôm [5] đây là mầm bệnh đáng báo động của động vật biển và quần thể nuôi trồng thủy sản, chúng có thể gây nhiễm trùng nghiêm trọng ở người thông qua việc tiêu thụ hải sản và các sản phẩm nuôi trồng thủy sản bị ô nhiễm [6].

Hiện nay, thực khuẩn thể được sử dụng rộng rãi như một tác nhân kiểm soát sinh học trong ngành công nghiệp thực phẩm và nông nghiệp, xử lý nước thải và nuôi trồng thủy sản [7]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng việc áp dụng trực tiếp thực khuẩn thể hoặc hỗn hợp thực khuẩn thể vào thực phẩm có thể làm giảm đáng kể sự ô nhiễm với các mầm bệnh truyền qua thực phẩm khác nhau [8]. Trần Trung Tú và cộng sự (2018) đã đánh giá được hiệu quả phòng trị bệnh do vi khuẩn *E. coli* gây ra trên gà đối với thực khuẩn thể BT.PR3, HG.PR3 và HG.PD5 [9]. Phạm-Khanh và cộng sự (2019) cho thấy thực khuẩn thể KIT03 có thể lây nhiễm vào vi khuẩn *E.coli* O157:H7, typ huyết thanh *Salmonella enterica* *Choleraesuis* và *Enteritidis* nghiên cứu báo cáo rằng thực khuẩn thể (TKT) Φ KIT03 có thể tiêu diệt vi khuẩn được thử nghiệm và ngăn chặn sự phát triển của chúng [10]. Liệu pháp thực khuẩn thể cũng được tiến hành trong điều kiện *in vivo*, chứng minh thực khuẩn thể có thể kiểm soát nhiễm trùng do vi khuẩn ở cá, tôm và các sản phẩm thủy sản khác trong nuôi trồng thủy sản [11], [12]. Trong các thử nghiệm ở trại giống, việc xử lý bằng thực khuẩn thể đối với ấu trùng *Penaeus monodon* bị nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi* đã mang lại tỷ lệ sống sót của ấu trùng trên 85% và chứng minh thực khuẩn thể sẽ là sự thay thế hiệu quả cho kháng sinh [13]. Nghiên cứu về đánh giá hiệu quả điều trị của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cho kết quả đầy triển vọng. Nghiên cứu chỉ ra sau 24h xử lý thực khuẩn thể làm mật số vi khuẩn trong nước giảm mạnh từ $4,6 \times 10^4$ CFU/ml xuống còn $6,5 \times 10^2$ CFU/ml và sau 2 ngày mật số vi khuẩn tiếp tục giảm là $3,3 \times 10^2$ CFU/ml [14]. Chan và cộng sự (2018) đã chứng minh những loại virus trên không độc hại đối với con người và có thể phân hủy màng sinh học của vi khuẩn nhờ các enzyme kháng khuẩn (enzymotic). Loại enzyme này là các protein được mã hóa bởi các thực khuẩn thể, được chứng minh là có triển vọng hơn thuốc kháng sinh [15].

Trong nghiên cứu này, hai thực khuẩn thể được xác định là có phổ ký chủ rộng lây nhiễm trên các chủng vi khuẩn *Salmonella*, *Vibrio* và *E.coli* là Φ VT232 và Φ 5A, được phân lập từ nước thải ao tôm tại Vĩnh Thuận, Kiên Giang được sàng lọc và tinh sạch. TKT Φ VT232 được chọn để tiến hành khảo sát các đặc điểm sinh học về ảnh hưởng nhiệt độ và pH. Việc khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH có thể sẽ giúp ích rất nhiều trong việc mở rộng hơn những nhận thức về thực khuẩn thể của vi khuẩn *Salmonella* cũng như cung cấp một thực khuẩn thể tiềm năng trong việc kiểm soát các dòng vi khuẩn *Salmonella* spp. và *Vibrio* spp.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn làm ký chủ (Bảng 1) là các dòng vi khuẩn của ATCC và NCTC. Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi Tryptic soy broth (TSB) và môi trường thạch TSA (TSB bổ sung 1,5% agar) ở 37°C lắc ở tốc độ 120 vòng trên phút trong 24 giờ.

Bảng 1. Các dòng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Mã vi khuẩn	Tên đầy đủ
1	ATCC 49223	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 49223
2	ATCC 14028	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028
3	ATCC 13076	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076
4	ATCC 17802	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802
5	NCTC 10884	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10884
6	NCTC 10885	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10885
7	ATCC 29307	<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 29307
8	NCTC 11218	<i>Vibrio vulnificus</i> NCTC 11218
9	ATCC 25922	<i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922

2.2. Phân lập và tách dòng thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể được phân lập từ nước và bùn đáy của các ao tôm ở Kiên Giang, Sóc Trăng và Hậu Giang. Hỗn hợp gồm 2,5 mL mẫu và 7,5 mL môi trường TSB tiến hành lắc với tốc độ 120 vòng/phút ở 37°C trong 24 giờ. Dịch tăng sinh sau đó ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, rút phần dịch trong chuyển sang ống mới, thu được các dòng thực khuẩn thể thô. Tiếp đến, 200 µL vi khuẩn *Salmonella* (10^6 CFU/mL) được nuôi cấy qua đêm trộn với 5 mL môi trường TSA bán rắn đã được ủ ở 56°C và trải lên đĩa thạch TSA (phương pháp double layer agar – drop method) [16]. Thực khuẩn thể được nhỏ lên mặt môi trường bán rắn chứa vi khuẩn 2 µL/giọt ủ ở 37°C trong 24 giờ. Các đĩa được quan sát để tìm sự hiện diện của vết tan. Các vết tan trong suốt được thu thập vào Eppendorf 1,5 mL chứa dung dịch đệm natri clorua magie sulfat (SM buffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄ và 0,01% gelatin). Thực khuẩn thể được tách dòng bằng phương pháp khảo sát vết tan bằng agar hai lớp (double layer agar – plaque assay) dựa trên sự đồng đều của vết tan [16].

2.3. Hiệu giá thực khuẩn thể

Hiệu giá thực khuẩn thể được xác định bằng phương pháp agar hai lớp [16]. Rút 100 µL huyền phù thực khuẩn thể được pha loãng thích hợp và 100 µL huyền phù vi khuẩn cho vào ống Eppendorf 1,5 mL mix nhanh và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó chuyển hỗn hợp huyền phù vào ống nghiệm chứa môi trường TSA.

Hiệu giá thực khuẩn thể được tính theo công thức:

$$\text{Phage titer} = N \times \frac{1}{DF} \times \frac{1}{V}$$

Trong đó, N là số lượng vết tan trong một đĩa cụ thể, DF là hệ số pha loãng phage cho đĩa đó và V là thể tích gốc phage được rút ra ban đầu, tính bằng mL. Con số kết quả được đưa ra dưới dạng đơn vị hình thành vết tan trên mililit (pfu/mL). Thí nghiệm được lặp lại ba lần để đảm bảo tính chính xác cho nghiên cứu [17].

2.4. Phạm vi vật chủ của thực khuẩn thể

Phạm vi vật chủ của thực khuẩn thể được xác định bằng phương pháp nhỏ giọt trên bề mặt hai lớp agar sử dụng các chủng vi khuẩn được mô tả trong Bảng 1 [16]. Cho vào đĩa môi trường TSA hỗn hợp gồm 5 mL môi trường TSA (agar 0,5%) và 100 µL huyền phù vi khuẩn, phơi đĩa 15-20 phút. Sau đó, dùng micropipet rút 5 µL huyền phù từng dòng thực khuẩn thể nhỏ vào các ô tương ứng. Ủ qua đêm sau 24 giờ, quan sát sự hình thành vết tan dựa trên các đặc điểm, vết tan trong, đục và không phản ứng (thí nghiệm được lặp lại ba lần) [18].

2.5. Phân tích độ ổn định nhiệt và pH

Độ ổn định nhiệt được xác định bằng cách nuôi cấy các mẫu thực khuẩn thể đã phân lập và tinh khiết ở -20, 4, 37, 60 và 70°C, hiệu giá của thực khuẩn thể được xác định bằng phương pháp khảo sát vết tan bằng agar hai lớp ở 30 phút và 60 phút sau nuôi cấy [18]. Độ ổn định pH được xác định

bằng cách trộn các mẫu thực khuẩn thể đã phân lập và đã tinh chế trong một loạt ống nghiệm chứa dung dịch đệm SM (50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄ và 0,01% gelatin) với các giá trị pH khác nhau (2; 3; 5; 7; 9 và 10), (nghiệm thức đối chứng được sử dụng ở pH=7,5). Sau khi ủ ở 37°C trong hai giờ, hiệu giá thực khuẩn thể được xác định bằng phương pháp khảo sát vết tan bằng agar hai lớp.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập, sàng lọc và xác định phạm vi ký chủ của thực khuẩn thể

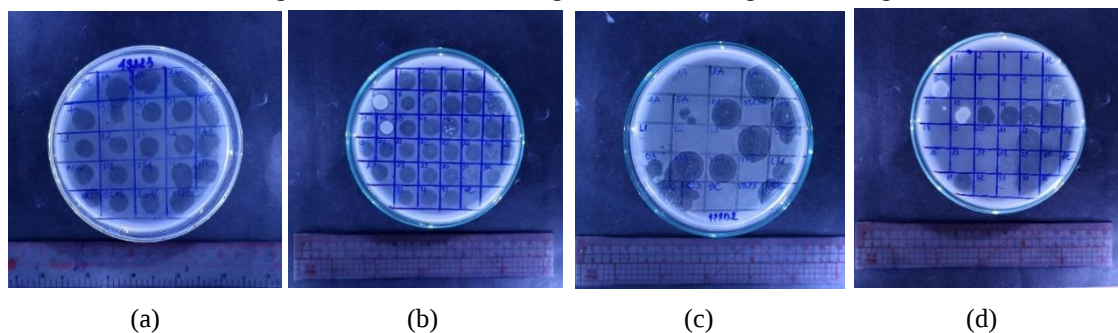
Bốn mươi chín dòng thực khuẩn thể được khảo sát khả năng ly giải đối với vi khuẩn ký chủ là các dòng vi khuẩn của ATCC (Bảng 2). Hai dòng thực khuẩn thể có phổ ký chủ rộng là Φ Pm5 và Φ Pm12 với khả năng lây nhiễm lần lượt là 9/9 và 8/9 dòng vi khuẩn, tuy nhiên kích thước các vết tan khá nhỏ và đục. Điều này chứng tỏ khả năng lây nhiễm của hai dòng thực khuẩn thể này khá thấp. Mười dòng thực khuẩn thể có khả năng lây nhiễm trên cả bốn chủng vi khuẩn khác nhau là *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *V.parahaemolyticus* và *E.coli* là Φ KG76, Φ GR76, Φ b1, Φ V18, Φ V84, Φ 3A, Φ 5A, Φ V85, Φ Mix và Φ 03. Đặc biệt, đường kính vết tan của các dòng thực khuẩn thể này lớn và trong hơn. Có thể thấy các dòng thực khuẩn thể này là thực khuẩn đa ký chủ [19]. Một số nghiên cứu đã chứng minh các thực khuẩn thể đa ký chủ bao gồm vB_EcoM_swi3 ly giải vi khuẩn *Salmonella* và *E.coli* [20], KFS-EC3 ly giải vi khuẩn *E.coli*, *Salmonella* và *Shigella* [21], Pef1 ly giải vi khuẩn *Pseudomonas* và *E.coli* [22]. Nghiên cứu của Malki và cộng sự (2015) [23] đã phát hiện được bốn thực khuẩn thể là Φ Fenriz, Φ Habibi, Φ Moody và Φ Vader có khả năng lây nhiễm trên cả bốn chủng vi khuẩn *P.aeruginosa* (ATCC 15692), *E.coli* (ATCC 8739), *Arthobacterium* sp. và *Microbacterium* sp.. Như vậy, phạm vi ký chủ của thực khuẩn thể không chỉ có thể lây nhiễm trong cùng một loài mà còn có thể lây nhiễm chéo giữa các loài. Thực khuẩn thể VT232 và thực khuẩn thể 5A là hai thực khuẩn thể được chọn để tiến hành tinh sạch và nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh lý cũng như cấu trúc bộ gen. Hình 2a và 2c cho thấy các vết tan của thực khuẩn thể Φ VT232 và Φ 5A có hình dạng và kích thước khác nhau, sau các lần sàng lọc và tinh chế các mảng thực khuẩn thể Φ VT232 và Φ 5A có kích thước và hình dạng đồng nhất (Hình 2b và Hình 2d).

Bảng 2. Phổ ký chủ của 49 dòng thực khuẩn thể trên 9 dòng vi khuẩn ATCC và NCTC

STT	Mã thực khuẩn thể	Nguồn phân lập	ATCC 49223	ATCC 14028	ATCC 13076	ATCC 17802	NCTC 10885	NCTC 10884	ATCC 29307	NCTC 11218	ATCC 25922
1	Pm1	Bùn đáy	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+
2	Pm2	Bùn đáy	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+
3	Pm3	Bùn đáy	+++	+	+	-	-	-	-	-	+
4	Pm4	Bùn đáy	+++	+	-	-	-	-	-	-	+
5	Pm5	Bùn đáy	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Pm6	Bùn đáy	+++	++	-	-	-	-	-	-	+
7	Pm7	Bùn đáy	++	-	-	-	-	-	-	-	+
8	Pm8	Bùn đáy	+++	+	+	-	-	-	-	-	+
9	Pm9	Bùn đáy	+++	-	+	-	-	-	-	-	+
10	Pm10	Bùn đáy	++	+	+	+	-	-	-	+	+
11	Pm11	Bùn đáy	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
12	Pm12	Bùn đáy	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13	Pm13	Bùn đáy	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-
14	Pm14	Bùn đáy	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-
15	Pm15	Bùn đáy	++	+	+	+++	-	-	+	+	-
16	Pm16	Bùn đáy	++	++	+	+++	-	-	-	-	-
17	V232	Ao tôm	+++	+	+	-	-	-	-	-	+
18	Gr1	Lò mổ	+++	+	+	-	-	-	-	-	-
19	Gr2	Lò mổ	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
20	Gr3	Lò mổ	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+

STT	Mã thực khuẩn thể	Nguồn phân lập	ATCC 49223	ATCC 14028	ATCC 13076	ATCC 17802	NCTC 10885	NCTC 10884	ATCC 29307	NCTC 11218	ATCC 25922
21	5A_23	Ao tôm	++	+	+	+	-	-	-	-	+
22	5A_02	Ao tôm	++	+	-	+	-	-	-	-	-
23	VT232	Ao tôm	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
24	5A	Ao tôm	++	++	-	+	-	-	-	-	+
25	231	Ao tôm	++	++	-	-	-	-	-	-	+
26	232	Ao tôm	+++	++	-	-	-	-	-	-	+
27	233	Ao tôm	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+
28	234	Ao tôm	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+
29	KG76	Ao tôm	+++	+++	++	+++	-	-	-	-	+++
30	GR76	Lò mổ	+++	+++	++	++	-	-	-	+	+++
31	b1	Bùn đáy	+++	++	+++	+++	-	-	-	-	++
32	Vth2	Ao tôm	++	+++	+	-	-	-	-	-	-
33	Vth28	Lò mổ	++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++
34	V18	Ao tôm	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++
35	V84	Ao tôm	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++
36	4A	Ao tôm	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-
37	3A	Ao tôm	+++	+	+++	+++	-	-	-	-	++
38	2A	Ao tôm	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-
39	1A	Ao tôm	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-
40	V85	Ao tôm	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++
41	L1	Ao tôm	+++	++	+++	-	-	-	-	-	+
42	L2	Ao tôm	++	+	+++	-	-	-	-	-	-
43	L3	Ao tôm	+++	+	+++	-	-	-	-	-	+
44	L4	Ao tôm	+++	+	+++	+++	-	-	-	-	+
45	Mix	Ao tôm	++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++
46	GR23	Lò mổ	+++	++	+++	++	-	-	-	-	-
47	03	Ao tôm	++	+	+++	++	-	-	-	-	+++
48	01	Ao tôm	+++	+	+++	++	-	-	-	-	-
49	L32	Ao tôm	++	+++	+++	+	-	-	-	-	-

Ghi chú: +++: vết tan trong rõ, ++: vết tan khá trong; +: vết tan không rõ; -: không có vết tan



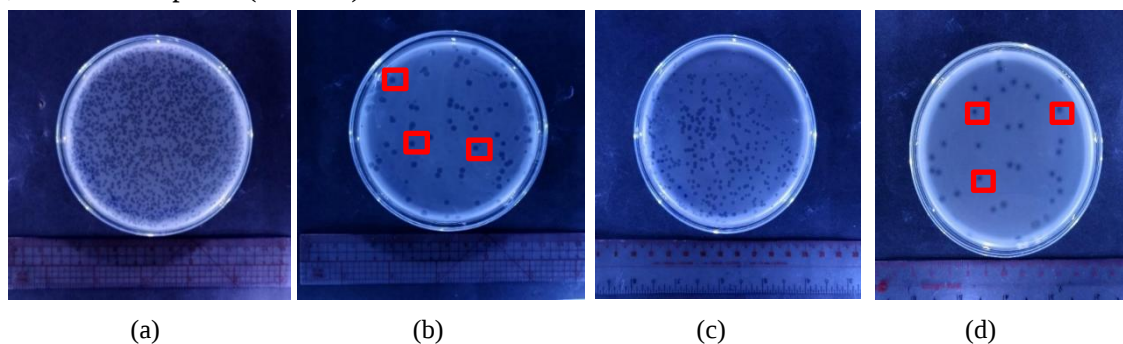
Hình 1. Sự hình thành vết tan của 49 dòng thực khuẩn thể trên vi khuẩn *S. enterica subsp enterica serovar Enteritidis* ATCC 49223 (a,b) và vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (c,d)

(Thử nghiệm khảo sát vết tan được thực hiện bằng phương pháp nhỏ giọt trên bề mặt agar hai lớp. Các vết tan xuất hiện trong và rõ trên nền đục của vi khuẩn.)

3.2. Độ ổn định nhiệt độ và pH

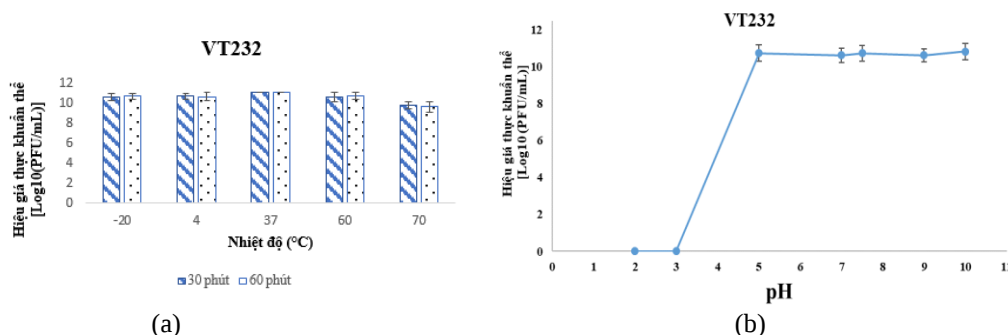
Để nghiên cứu khả năng tồn tại của thực khuẩn thể VT232 trong các điều kiện môi trường khác nhau, độ ổn định nhiệt độ và pH của thực khuẩn thể được ước tính bằng cách xác định khả năng sống sót dựa trên sự hình thành vết tan (PFU). Thực khuẩn thể VT232 được phát hiện là duy trì mức độ lây nhiễm cao sau khi ủ ở nhiệt độ -20, 4, 37 và 60°C trong 30 phút và 60 phút tương ứng,

nhưng nhạy cảm ở nhiệt độ 70°C. Độ ổn định của thực khuẩn thể VT232 giảm dần khi tăng thời gian ủ cùng nhiệt độ (Hình 3a). Ngoài ra, độ ổn định của thực khuẩn thể VT232 được đo ở pH 2, 3, 5, 7, 9 và 10 (đối chứng ở pH=7,5). Dữ liệu cho thấy thực khuẩn thể VT232 duy trì hoạt động tốt trong điều kiện pH 5-10 và hoạt động giảm đáng kể ở pH 2-4, hầu như thực khuẩn thể VT232 bị ức chế khi ở pH=2 (Hình 3b).



Hình 2. Phân lập và tinh sạch thực khuẩn thể VT232 (a,b) và thực khuẩn thể 5A (c,d).

(a) Dịch lọc thô của thực khuẩn thể VT232; (b) Dịch lọc của thực khuẩn thể VT232 sau khi được tinh sạch (các kí hiệu ô vuông đỏ thể hiện hình thái vết tan của thực khuẩn thể VT232); (c) Dịch lọc thô của thực khuẩn thể 5A; (d) Dịch lọc của thực khuẩn thể 5A sau khi được tinh sạch (các kí hiệu ô vuông đỏ thể hiện hình thái vết tan của thực khuẩn thể 5A).



Hình 3. Độ ổn định nhiệt (a) và pH (b) của thực khuẩn thể VT232

Kết quả này phù hợp với hầu hết các nghiên cứu cho thấy rằng các thực khuẩn thể có khả năng kháng kiềm tốt hơn acid và ổn định ở nhiệt độ dưới 60°C [24], [25]. Theo một số báo cáo liên quan, thực khuẩn thể ϕ vB_SalP_LDW16 được phát hiện có tính ổn định trong nhiệt độ 40-60°C và giảm khi nhiệt độ trên 60°C, hiệu giá của ϕ vB_SalP_LDW16 giảm đáng kể khi pH<5 và bất hoạt khi pH có giá trị bằng 2 [26]; thực khuẩn thể ϕ P23 ổn định trong khoảng nhiệt độ 4-65°C và pH 5-10 [27]; thực khuẩn thể ϕ vB_VpS_BA3 và ϕ vB_VpS_CA8 đều ổn định trong khoảng nhiệt độ 20-40°C và bất hoạt ở 60°C; thực khuẩn thể ϕ vB_VpS_BA3 ổn định trong khoảng pH 6-7 và thực khuẩn thể ϕ vB_VpS_CA8 ổn định trong khoảng pH 5-7 và gần như bất hoạt khi giá trị pH bằng 4 [28]; thực khuẩn thể ϕ vB_ValP_VA-RY-3 ổn định trong khoảng nhiệt độ từ 4-56°C có hoạt tính cao trong khoảng 4-37°C và pH 2-10 [29]; thực khuẩn thể ϕ vB_SalP_TR2 ổn định trong khoảng 4-60°C và pH 4-11 [18].

4. Kết luận

Nghiên cứu phân lập được 49 dòng thực khuẩn thể từ nước và bùn đáy ao tôm. Phát hiện hai dòng có phổ ký chủ rộng lây nhiễm lần lượt 9/9 và 8/9 dòng ký chủ, chín dòng thực khuẩn thể có khả năng ly giải vi khuẩn *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus* và *E. coli*. Thực khuẩn thể VT232 có khả năng ly giải *S. enteritidis* và *S. typhimurium* với khả năng chịu nhiệt và độ ổn

định pH cao thể hiện hoạt tính kháng *Salmonella* vượt trội. Do đó, VT232 là một tác nhân kiểm soát sinh học đầy hứa hẹn, tiết kiệm chi phí và hiệu quả được áp dụng để kiểm soát các mầm bệnh chính do vi khuẩn *Salmonella* gây ra trong chăn nuôi và thủy sản.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hoàn thành với sự hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học do Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia Nafosted tài trợ (Mã số đề tài: 106.04-2019.335).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Hinchliffe, A. Butcher, and M. M. Rahman, "The AMR problem: demanding economies, biological margins, and co-producing alternative strategies," *Palgrave Commun*, vol. 4, no. 1, Art. no. 1, Nov. 2018, doi: 10.1057/s41599-018-0195-4.
- [2] K. Thornber, D. Verner-Jeffreys, S. Hinchliffe, M. M. Rahman, D. Bass, and C. R. Tyler, "Evaluating antimicrobial resistance in the global shrimp industry," *Reviews in Aquaculture*, vol. 12, no. 2, pp. 966-986, 2020, doi: 10.1111/raq.12367.
- [3] R. C. Okocha, I. O. Olatoye, and O. B. Adediji, "Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture," *Public Health Reviews*, vol. 39, no. 1, p. 21, Aug. 2018, doi: 10.1186/s40985-018-0099-2.
- [4] A. Patel *et al.*, "Prevalence of antibiotic resistant *Salmonella* spp. strains in shrimp farm source waters of Nagapattinam region in South India," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 155, Jun. 2020, Art. no. 111171, doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111171.
- [5] I. Frans, C. W. Michiels, P. Bossier, K. A. Willems, B. Lievens, and H. Rediers, "Vibrio anguillarum as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention," *Journal of Fish Diseases*, vol. 34, no. 9, pp. 643-661, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2761.2011.01279x.
- [6] L. Gao *et al.*, "Isolation and Characterization of a Lytic Vibriophage OY1 and Its Biocontrol Effects Against *Vibrio* spp.," *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, 2022. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.830692>. [Accessed Sep. 16, 2023].
- [7] M. D'Accolti, I. Soffritti, S. Mazzacane, and E. Caselli, "Bacteriophages as a Potential 360-Degree Pathogen Control Strategy," *Microorganisms*, vol. 9, no. 2, p. 261, Jan. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9020261.
- [8] 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, Oct. 2008, doi: 10.1128/AEM.01465-08.
- [9] T. T. Tran, B. V. T. Truong, and N. T. Nguyen, "Ability to resolve *Escherichia coli* bacteria of bacteriophages isolated from chicken farms in some Mekong Delta provinces," *Journal of Livestock Science and Technology*, vol. 233, pp. 83-89, 2018.
- [10] N. H. Pham-Khanh *et al.*, "Isolation, Characterisation and Complete Genome Sequence of a Tequatrovirus Phage, *Escherichia* phage KIT03, Which Simultaneously Infects *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*," *Curr Microbiol*, vol. 76, no. 10, pp. 1130-1137, Oct. 2019, doi: 10.1007/s00284-019-01738-0.
- [11] N. Matamp and S. G. Bhat, "Phage Endolysins as Potential Antimicrobials against Multidrug Resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: Current Status of Research and Challenges Ahead," *Microorganisms*, vol. 7, no. 3, Art. no. 3, Mar. 2019, doi: 10.3390/microorganisms7030084.
- [12] C. Nikapitiya, H. P. S. U. Chandrarathna, S. H. S. Dananjaya, M. De Zoysa, and J. Lee, "Isolation and characterization of phage (ETP-1) specific to multidrug resistant pathogenic *Edwardsiella tarda* and its in vivo biocontrol efficacy in zebrafish (*Danio rerio*)," *Biologicals*, vol. 63, pp. 14-23, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.biologicals.2019.12.006.
- [13] I. Karunasagar, M. M. Shivu, S. K. Girisha, G. Krohne, and I. Karunasagar, "Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages," *Aquaculture*, vol. 268, no. 1, pp. 288-292, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.049.
- [14] B. V. T. Truong, C. L. T. Nguyen, B. N. H. Le, H. K. T. Phan, and H. A. Pham, "Effective application of bacteriophages in the treatment of diseases caused by *Vibrio parahaemolyticus* on white leg shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*),” *Science and technology journal of agriculture and rural development*, vol. 2, pp. 163-169, 2021.
- [15] B. K. Chan, P. E. Turner, S. Kim, H. R. Mojibian, J. A. Eleftheriades, and D. Narayan, “Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*,” *Evolution, Medicine, and Public Health*, vol. 2018, no. 1, pp. 60-66, Jan. 2018, doi: 10.1093/emph/eoy005.
- [16] A. M. Kropinski, A. Mazzocco, T. E. Waddell, E. Lingohr, and R. P. Johnson, “Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay,” in *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, M. R. J. Clokie and A. M. Kropinski, Eds., in *Methods in Molecular Biology*TM, Totowa, NJ: Humana Press, 2009, pp. 69-76, doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7.
- [17] R. Luzon-Hidalgo, V. A. Risso, A. Delgado, B. Ibarra-Molero, and J. M. Sanchez-Ruiz, “A protocol to study bacteriophage adaptation to new hosts,” *STAR Protoc*, vol. 2, no. 3, Aug. 2021, Art. no. 100784, doi: 10.1016/j.xpro.2021.100784.
- [18] Y. Shang *et al.*, “Isolation and Characterization of a Novel Salmonella Phage vB_SalP_TR2,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, 2021. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.664810>. [Accessed Jan. 31, 2023].
- [19] S. Hagens and M. J. Loessner, “Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations,” *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 11, no. 1, pp. 58-68, Jan. 2010, doi: 10.2174/138920110790725429.
- [20] B. Sui, L. Han, H. Ren, W. Liu, and C. Zhang, “A Novel Polyvalent Bacteriophage vB_EcoM_swi3 Infects Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, 2021. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.649673>. [Accessed Sep. 05, 2023].
- [21] S.-H. Kim, D. E. Adeyemi, and M.-K. Park, “Characterization of a New and Efficient Polyvalent Phage Infecting *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Shigella sonnei*,” *Microorganisms*, vol. 9, no. 10, Oct. 2021, Art. no. 10, doi: 10.3390/microorganisms9102105.
- [22] P. Yu, J. Mathieu, M. Li, Z. Dai, and P. J. J. Alvarez, “Isolation of Polyvalent Bacteriophages by Sequential Multiple-Host Approaches,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 82, no. 3, pp. 808-815, Feb. 2016, doi: 10.1128/AEM.02382-15.
- [23] K. Malki *et al.*, “Bacteriophages isolated from Lake Michigan demonstrate broad host-range across several bacterial phyla,” *Virology Journal*, vol. 12, no. 1, p. 164, Oct. 2015, doi: 10.1186/s12985-015-0395-0.
- [24] N. K. El-DougDoug *et al.*, “Control of *Salmonella* Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages,” *Int J Food Microbiol*, vol. 293, pp. 60-71, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.003.
- [25] L. Jiang, R. Zheng, Q. Sun, and C. Li, “Isolation, characterization, and application of *Salmonella* paratyphi phage KM16 against *Salmonella* paratyphi biofilm,” *Biofouling*, vol. 37, no. 3, pp. 276-288, Mar. 2021, doi: 10.1080/08927014.2021.1900130.
- [26] S. Cao *et al.*, “Isolation and identification of the broad-spectrum high-efficiency phage vB_SalP_LDW16 and its therapeutic application in chickens,” *BMC Vet Res*, vol. 18, p. 386, Nov. 2022, doi: 10.1186/s12917-022-03490-3.
- [27] Y. Liu *et al.*, “Complete genomic sequence of bacteriophage P23: a novel *Vibrio* phage isolated from the Yellow Sea, China,” *Virus Genes*, vol. 55, no. 6, pp. 834-842, Dec. 2019, doi: 10.1007/s11262-019-01699-3.
- [28] M. Yang *et al.*, “Isolation and Characterization of the Novel Phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for Lysing *Vibrio parahaemolyticus*,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, 2020. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00259>. [Accessed: Nov. 29, 2022].
- [29] Y. Ren *et al.*, “Isolation and characterization of a novel phage vB_ValP_VA-RY-3 infecting *Vibrio alginolyticus*,” *Virus Research*, vol. 322, Dec. 2022, Art. no. 198945, doi: 10.1016/j.virusres.2022.198945.