

## ISOLATION OF BACTERIA FROM SHRIMP POND WASTEWATER WITH THE CAPACITY TO INHIBIT *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 AND *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 10885

Truong Thi Bich Van\*, Tran Thi Lieu

Institute of Food and Biotechnology - Can Tho University

| ARTICLE INFO                                                                                                                                        | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Received:</b> 04/11/2023</p> <p><b>Revised:</b> 25/3/2024</p> <p><b>Published:</b> 03/4/2024</p>                                              | <p>Six bacteriophage strains (Bacteriophage; TKT) ΦPVtH, ΦPCK1, ΦPVCt3, ΦPVCt4, ΦPDT4, ΦPDT3 that can lyse <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 were determined by the double-layer agar method. The results of the host spectrum survey with five bacterial species <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10884, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10885, <i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802, <i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 29307, showed that all six phage strains produced stains soluble on <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10885. The results of all six bacteriophage strains have affected the growth of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 through the OD600 measurement method and the bacterial population spread method. Six bacteriophage strains reduce the host bacterial population by up to 90%, of which ΦPCK1 reduces the highest bacterial population by 98%. The study results show that the use of bacteriophages has the potential to control pathogens and harmful bacteria such as <i>Pseudomonas</i> spp. and <i>Vibrio</i> spp.</p> |
| <p><b>KEYWORDS</b></p> <p>Double-layer agar</p> <p><i>Pseudomonas</i> spp.</p> <p>Bacterial host</p> <p><i>Vibrio</i> spp.</p> <p>Bacteriophage</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

## PHÂN LẬP THỰC KHUẨN THỂ TỪ NƯỚC THẢI AO NUÔI TÔM CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ VI KHUẨN *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 VÀ *Vibrioparahaemolyticus* ATCC 10885

Trương Thị Bích Vân\*, Trần Thị Liễu

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

| THÔNG TIN BÀI BÁO                                                                                                                              | TÓM TẮT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Ngày nhận bài:</b> 04/11/2023</p> <p><b>Ngày hoàn thiện:</b> 25/3/2024</p> <p><b>Ngày đăng:</b> 03/4/2024</p>                            | <p>Sáu dòng thực khuẩn thể (Bacteriophage; TKT) ΦPVtH, ΦPCK1, ΦPVCt3, ΦPVCt4, ΦPDT4, ΦPDT3 có thể ly giải <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 được xác định bằng phương pháp agar hai lớp. Kết quả khảo sát phổ ký chủ với năm loài vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10884, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10885, <i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802, <i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 29307, cho kết quả cả sáu dòng thực khuẩn thể này đều tạo vết tan trên vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10885. Kết quả cả sáu dòng thực khuẩn thể đều lây nhiễm và có ảnh hưởng lên sự phát triển của <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 thông qua phương pháp đo OD<sub>600</sub> và phương pháp trải đếm mật số vi khuẩn. Sáu dòng thực khuẩn thể làm giảm mật số vi khuẩn ký chủ lên đến 90%, trong đó ΦPCK1 làm giảm mật số vi khuẩn cao nhất đạt 98%. Kết quả của nghiên cứu cho thấy việc sử dụng thực khuẩn thể có khả năng kiểm soát mầm bệnh và vi khuẩn gây hại như <i>Pseudomonas</i> spp. và <i>Vibrio</i> spp..</p> |
| <p><b>TỪ KHÓA</b></p> <p>Agar hai lớp</p> <p><i>Pseudomonas</i> spp.</p> <p>Phổ ký chủ</p> <p><i>Vibrio</i> spp.</p> <p>Thực khuẩn thể (Φ)</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9149>

\* Corresponding author. Email: [ttbvan@ctu.edu.vn](mailto:ttbvan@ctu.edu.vn)

## 1. Đặt vấn đề

*Pseudomonas aeruginosa* là trực khuẩn gram âm hiện diện trong môi trường nước và có khả năng gây bệnh cho tôm, cá. Cùng với *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. cũng là vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản như: bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND), bệnh phát sáng, đỏ thân, mòn kitin... vẫn xuất hiện ở nhiều vùng nuôi. Trong đó, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio alginolyticus* và *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* là nguyên nhân chủ yếu gây ra bệnh trên tôm [1]. Với tình trạng kháng kháng sinh trên tôm nuôi khi mắc bệnh ngày càng tăng, sự quan tâm đến việc điều trị bệnh do vi khuẩn bằng thể thực khuẩn (liệu pháp thể thực khuẩn) ngày càng được quan tâm.

Sử dụng thực khuẩn thể như là một biện pháp sinh học để kiểm soát bệnh đã được phát triển trong những năm qua. Liệu pháp thực khuẩn thể là một phương pháp điều trị thay thế thân thiện với môi trường đã được chứng minh để ngăn ngừa và kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản [2]. Kết quả thực nghiệm với động vật biển đã chứng minh hiệu quả điều trị của liệu pháp thực khuẩn thể đối với các bệnh truyền nhiễm do *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Enterococcus seriolocida*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas plecoglossicida* và *Lactococcus garvieae*. Thông thường, thực khuẩn thể được tìm thấy với số lượng lớn ở bất kỳ nơi nào vật chủ sinh sống, trong chất thải, đất, trại giống hoặc trong nguồn nước. Thực khuẩn thể có thể làm cho khuẩn lạc của vi khuẩn nhỏ lại sau 12 giờ nhiễm vào *P. aeruginosa* [3] (thay đổi hình dạng, kích thước). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy rằng hầu hết khuẩn lạc đều bị ảnh hưởng bởi TKT [4], *E.coli* SP427 sau khi ủ 16 giờ với TKT P1<sub>vir</sub>, khuẩn lạc chỉ thể hiện huỳnh quang mờ nhạt khi quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang, thể hiện dấu vết của vi khuẩn đã chết. Ở Việt Nam, cho đến nay có rất ít nghiên cứu về sự tương tác giữa thực khuẩn thể và vi khuẩn, đặc biệt là nhóm vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh trên tôm. Nghiên cứu của Trương Thị Bích Vân và cộng sự (2023) cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn của TKT được chứng minh, sau 24 giờ xử lý bởi thực khuẩn thể, mật độ vi khuẩn trong nước giảm mạnh từ  $4,6 \times 10^4$  CFU/ml xuống còn  $6,5 \times 10^2$  CFU/ml, mật độ vi khuẩn trong gan tụy tôm từ  $2,3 \times 10^5$  CFU/mL giảm xuống  $1,1 \times 10^2$  CFU/con. Về khả năng hồi phục của tôm, sau hai ngày xử lý bởi TKT, tôm bắt đầu ăn lại, gan tụy cũng sẫm màu hơn, ruột đầy đặn, kết quả phân tích mô học cho thấy cấu trúc mô bị tổn thương do nhiễm khuẩn cũng được phục hồi. TKT đã phát huy hiệu quả trong việc kiểm soát hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra ở tôm thẻ chân trắng [5]. Nghiên cứu về TKT Φ21 đã làm thay đổi kích thước và màu sắc khuẩn lạc *Vibrio* sp. B1.1 [6]. Thực khuẩn thể còn có thể kết hợp với cao chiết để ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* B4XT4 và B4X0T2.2 [7]. Những kết quả này cho thấy thực khuẩn thể có tiềm năng ứng dụng trong việc phòng trị bệnh nhiễm khuẩn trong nuôi trồng thủy sản. Nghiên cứu được tiến hành với mục đích phân lập được các dòng thực khuẩn thể có khả năng ức chế vi khuẩn *P. aeruginosa* và vi khuẩn *V. parahaemolyticus* từ mẫu nước và mẫu bùn đáy ao nuôi thủy sản.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Các chủng vi khuẩn

Các vi khuẩn làm ký chủ (Bảng 1) có nguồn gốc từ ATCC (American Type Culture Collection). Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Tryptic soy broth (TSB) và môi trường thạch TSA (Tryptic soy broth bổ sung 1,5% agar) ở 37°C lắc ở tốc độ 120 vòng trên phút trong 24 giờ.

### 2.2. Phân lập thực khuẩn thể

Mẫu nước, bùn đáy ao nuôi thủy sản được cho vào môi trường TSB ủ trên máy lắc (khoảng 150 vòng/phút) ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ để tăng sinh thực khuẩn thể có trong mẫu gốc. Sau đó huyền phù vi khuẩn được hoà trộn với 1% thể tích chloroform, giữ lạnh 30 phút, ly tâm dung dịch với vận tốc 12000 rpm trong 10 phút thu phần dịch trong là dịch thực khuẩn thể thô.

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

| STT | Mã vi khuẩn | Tên đầy đủ                                |
|-----|-------------|-------------------------------------------|
| 1   | ATCC 27853  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853  |
| 2   | NCTC 10884  | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10884 |
| 3   | NCTC 10885  | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 10885 |
| 4   | NCTC 11218  | <i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218        |
| 5   | ATCC 17802  | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 |
| 6   | ATCC 29307  | <i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 29307       |

### 2.3. Khảo sát khả năng xâm nhiễm của các dòng thực khuẩn thể đã phân lập

Đánh giá khả năng xâm nhiễm của thực khuẩn thể bằng phương pháp thử nghiệm vết tan

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và sử dụng phương pháp agar hai lớp [8]. Trộn đều 100  $\mu$ L vi khuẩn với môi trường bán đặc ở 56°C sau đó đổ lên đĩa môi trường nền. Hút 2  $\mu$ L thực khuẩn thể nhỏ lên đĩa và ủ ở 30°C trong 24 giờ, quan sát vết tan.

### 2.4. Khảo sát khả năng ức chế của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn

Phương pháp đo OD<sub>600</sub>

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm trong môi trường TSB lỏng và ủ ở 37°C với tốc độ 120 vòng/phút. 100  $\mu$ L vi khuẩn và 100  $\mu$ L phage được trộn lẫn và đưa vào một đĩa 96 giếng. Đĩa 96 giếng được ủ ở 120 vòng/phút ở 37°C và đo OD<sub>600</sub> mỗi 30 phút trong 120 phút.

Phương pháp trải đếm mật số vi khuẩn

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại và sử dụng phương pháp trải đếm để đánh giá phần trăm vi khuẩn bị ức chế bởi các dòng thực khuẩn thể. Trải 100  $\mu$ L hỗn hợp huyền phù vi khuẩn và 10  $\mu$ L thực khuẩn thể trên môi trường. Đĩa được ủ ở 30°C và tiến hành đếm số khuẩn lạc của vi khuẩn xuất hiện sau 24 giờ.

## 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

### 3.1. Phổ ký chủ của các dòng thực khuẩn thể đã phân lập

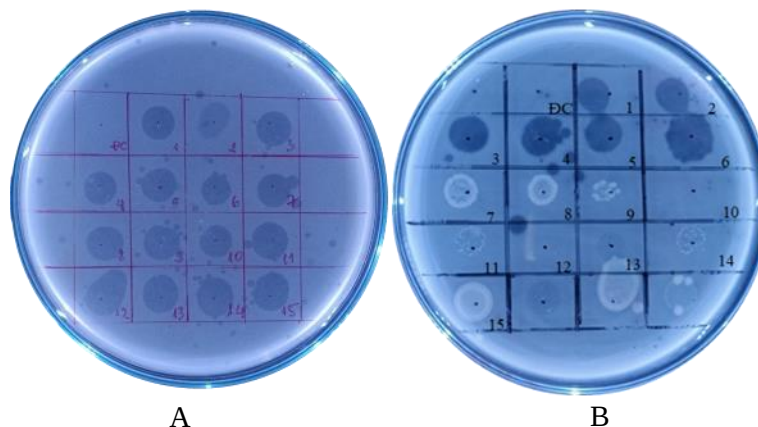
**Bảng 2.** Phổ ký chủ của 15 dòng thực khuẩn thể trên 6 dòng vi khuẩn

| STT | Mã thực khuẩn thể | Nguồn phân lập | ATCC 27853 | ATCC 17802 | NCTC 10885 | NCTC 10884 | ATCC 29307 | NCTC 11218 |
|-----|-------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1   | PVtH              | Nước lò mổ heo | ++         | -          | +          | -          | -          | -          |
| 2   | PCK1              | Nước ao cá     | ++         | -          | +          | -          | -          | -          |
| 3   | PVCt3             | Nước ao tôm    | ++         | -          | +          | -          | -          | -          |
| 4   | PVCt4             | Nước ao tôm    | ++         | -          | +          | -          | -          | -          |
| 5   | PDT4              | Gan tụy tôm    | ++         | -          | +          | -          | -          | -          |
| 6   | PDT3              | Gan tụy tôm    | ++         | -          | +          | -          | -          | -          |
| 7   | PCK1.1            | Nước ao cá     | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 8   | PCK1.2            | Nước ao cá     | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 9   | PCK2              | Nước ao cá     | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 10  | PCK3              | Nước ao cá     | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 11  | PCK4              | Nước ao cá     | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 12  | PDT4.1            | Gan tụy tôm    | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 13  | PDT4.2            | Gan tụy tôm    | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 14  | PDT4.3            | Gan tụy tôm    | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |
| 15  | PDT4.4            | Gan tụy tôm    | ++         | -          | -          | -          | -          | -          |

Ghi chú: ++: ký chủ chính; +: xuất hiện vết tan; -: không có vết tan

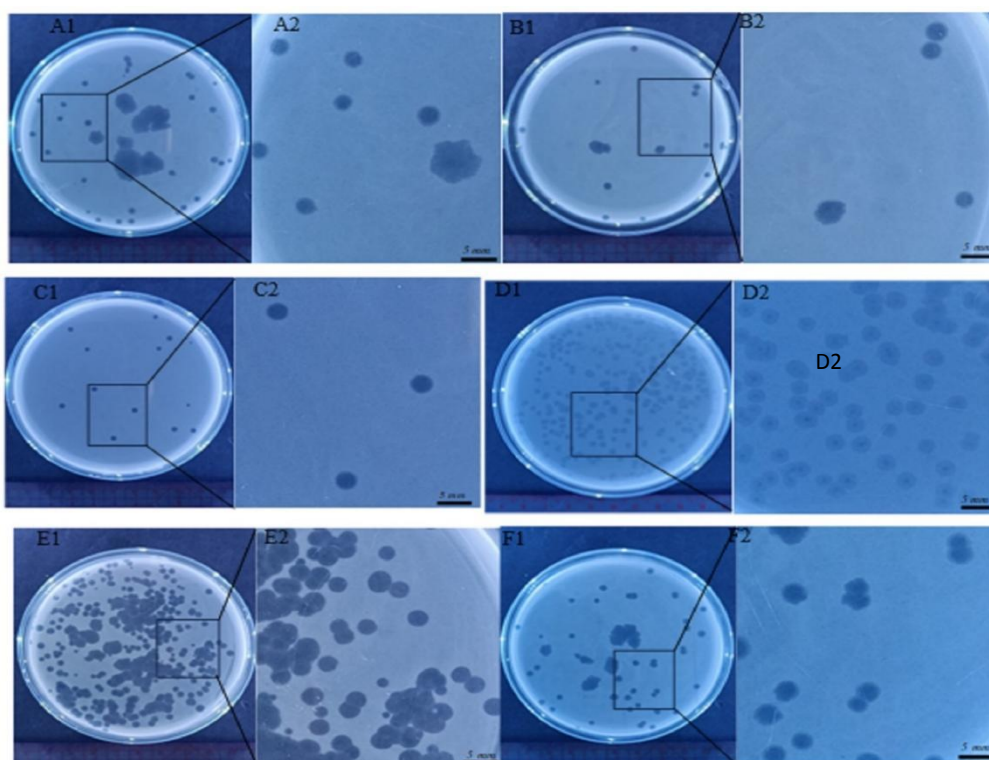
Khảo sát phổ ký chủ của 15 dòng thực khuẩn thể bằng phương pháp agar 2 lớp để đánh giá khả năng xâm nhiễm của 15 dòng thực khuẩn trên vi khuẩn khác nhau (Bảng 2). Kết quả cho thấy 15 dòng thực khuẩn thể đã tạo ra các vết tan trong và rõ trên vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Hình 1) và 6 dòng thực khuẩn thể  $\Phi$ PVtH;  $\Phi$ PCK1;  $\Phi$ PVCt3;  $\Phi$ PVCt4;  $\Phi$ PDT4;

ΦPDT3 có khả năng hình thành vết tan trên ký chủ *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885 nhưng không tạo vết tan trên các chủng vi khuẩn khác. Đã có nhiều nghiên cứu về thực khuẩn thể đa ký chủ như thể thực khuẩn *Escherichia* KIT03 được phân lập từ đất của một trang trại gia cầm ở Kyoto, Nhật Bản. KIT03 có thể lây nhiễm *Escherichia coli* O157:H7 và các tuýp huyết thanh *Salmonella enterica* Choleraesuis và Enteritidis [9]. Một nghiên cứu khác về thực khuẩn thể đa ký chủ khi thực khuẩn thể PEa1, PEa2, Pea3, PEf1, PEf2 có thể ly giải *Pseudomonas* và *E.coli* [10].



**Hình 1.** Khảo sát phạm vi ký chủ của 15 dòng thực khuẩn thể  
 Chú thích: (A) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853;  
 (B) *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 10885

### 3.2. Phương pháp xét nghiệm vết tan (plaque assay)



**Hình 2.** Vết tan của các dòng thực khuẩn thể trên ký chủ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Chú thích: (A) ΦPVIH; (B) ΦPCK1; (C) ΦPVCt3; (D) ΦPVCt4; (E) PDT4; (F) ΦPDT3.  
 (Thử nghiệm khảo sát vết tan được thực hiện bằng phương pháp agar hai lớp, các vết tan xuất hiện trong và rõ so với nền đục của vi khuẩn)

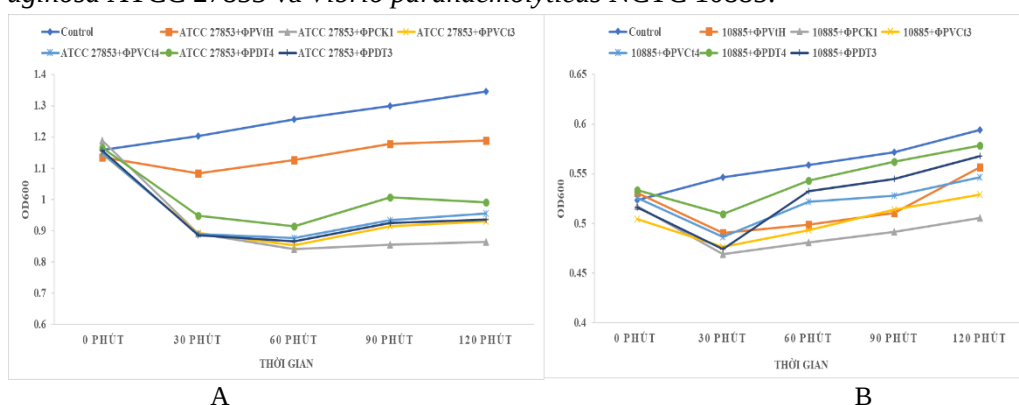
Kết quả đánh giá phổ ký chủ (Bảng 2), 6 dòng thực khuẩn thể  $\Phi$ PVtH;  $\Phi$ PCK1;  $\Phi$ PVCT3;  $\Phi$ PVCT4;  $\Phi$ PDT4;  $\Phi$ PDT3 có khả năng hình thành vết tan với *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885.

Đường kính vết tan thể hiện khả năng phân giải hoàn toàn hay không hoàn toàn và khả năng kháng lại của vi khuẩn đối với thực khuẩn thể trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy 6 dòng thực khuẩn thể tạo ra vết tan có đường kính từ 0,5 mm đến 4 mm ( $n = 10$ ). Trong đó, thực khuẩn thể  $\Phi$ PDT3 có đường kính vết tan lớn nhất là 4,03 mm và  $\Phi$ PCK1 có đường kính vết tan nhỏ nhất là 0,50 mm (Hình 2).

Theo nghiên cứu [11], một thực khuẩn thể mới được phân lập trong nước thải, vB-PseuP-SA22, sử dụng chủng CRPA *P. aeruginosa* B10 làm vật chủ có đường kính vết tan  $1,5 \pm 2,5$  mm. Nghiên cứu [12] đã phân lập thực khuẩn DRL-P1 từ một cơ sở xử lý chất thải có khả năng kiểm soát vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và DRL-P1 tạo ra các mảng vết tan nhỏ nhưng trong suốt có đường kính khoảng  $2 \pm 0,23$  mm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu [13] đã phân lập thực khuẩn thể vB-PaeS-VL1 từ các mẫu nước thải, thực khuẩn thể VL1 tạo ra các mảng lớn, trong và tròn với đường kính dao động từ 4–5 mm.

### 3.3. Ảnh hưởng của thực khuẩn thể lên sự phát triển của vi khuẩn qua phương pháp đo OD

Theo dõi động học tăng trưởng của vi khuẩn khi có sự xâm nhiễm của thực khuẩn thể được thực hiện trên đĩa 96 giếng và đo độ đục của môi trường nuôi cấy ở mật độ quang học 600 nm là phương pháp đánh giá theo thời gian thực về tương tác giữa thực khuẩn thể và vi khuẩn. Trong nhiều trường hợp, việc theo dõi toàn bộ quá trình tăng trưởng theo thời gian thực của vi khuẩn là điều cần thiết vì vi khuẩn có thể tái phát triển sau khi bị ức chế hoặc ly giải tăng trưởng kéo dài. Kết quả cho thấy sự phát triển của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885 là tăng trưởng bình thường với sự gia tăng liên tục về OD trong suốt 120 phút (Hình 3). Đối với OD trong giếng có bổ sung sáu dòng thực khuẩn thể  $\Phi$ PVTH;  $\Phi$ PCK1;  $\Phi$ PVCT3;  $\Phi$ PVCT4;  $\Phi$ PDT4;  $\Phi$ PDT3 đều có sự giảm phát triển vi khuẩn trong 30 phút đầu ở cả hai dòng vi khuẩn. Ở thời gian 60 phút, OD của *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 có sự tăng trưởng trở lại khi bổ sung  $\Phi$ PVTH và tăng trở lại ở 5 dòng thực khuẩn thể còn lại sau 90 phút. OD của *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885 ở giếng có bổ sung  $\Phi$ PDT4 tiếp tục giảm sau 60 phút và cả 6 giếng đều tăng trở lại sau 90 phút. Điều này cho thấy khả năng khác nhau của sáu dòng thực khuẩn thể trong việc ảnh hưởng đến sự phát triển của *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885.



Hình 3. Ảnh hưởng của thực khuẩn thể lên sự phát triển của vi khuẩn trong 120 phút

Chú thích: A: OD<sub>600</sub> của *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

B: OD<sub>600</sub> của *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885

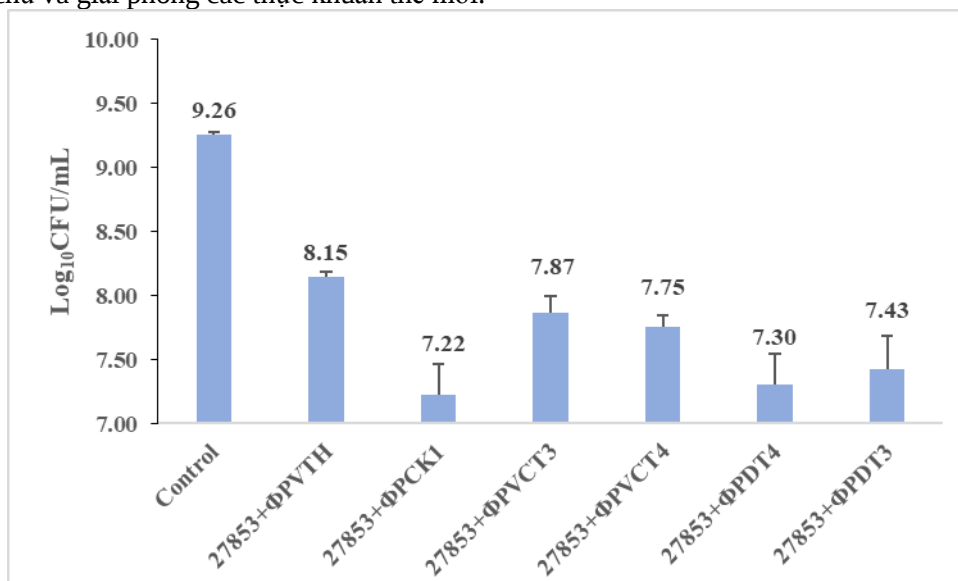
Đối với nhóm đối chứng không được xử lý bằng thực khuẩn thể, giá trị OD của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885 đạt 1,35 và 0,59 sau 120 phút, các giếng có bổ sung các thực khuẩn thể  $\Phi$ PVTH;  $\Phi$ PCK1;  $\Phi$ PVCT3;

ΦPVCT4; ΦPDT4; ΦPDT3 thì giá trị OD đều thấp hơn đối chứng sau 120 phút ( $p < 0,005$ ). Điều đó cho thấy OD thể hiện sự phát triển của vi khuẩn được xử lý bằng thực khuẩn thể vẫn giảm so với đối chứng, có khả năng ức chế vi khuẩn. Sự phát triển của vi khuẩn được xử lý bằng thực khuẩn thể vẫn giảm so với đối chứng.

Đã có nhiều nghiên cứu về động học tăng trưởng của vi khuẩn khi có sự xâm nhiễm của thực khuẩn thể. Nghiên cứu [14] báo cáo về thực khuẩn thể vB-Pae-QDWS làm giảm mật độ tế bào *P. aeruginosa* trong môi trường nuôi cấy so với đối chứng không có bổ sung thực khuẩn thể. Theo nghiên cứu [15] thực khuẩn thể vB-EcoS-B2 có thể làm giảm sự phát triển của *E. coli* MG1655 sau 30 phút lây nhiễm. Nghiên cứu [16] thực khuẩn thể phipa2, phipa4 và phipa10 có tác động rõ ràng đến *P. aeruginosa* ZS-PA-16 và ZS-PA-35.

### 3.4. Thực khuẩn thể làm giảm mật số vi khuẩn qua phương pháp trải đếm

Để thấy rõ hơn về sự tác động của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn, phương pháp trải đếm mật số vi khuẩn được thực hiện. Kết quả cho thấy tất cả 6 dòng thực khuẩn thể thực nghiệm đều có khả năng tương tác với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và ảnh hưởng đến mật số vi khuẩn (Hình 4). Nghiệm thức đối chứng chỉ có vi khuẩn được nuôi trong môi trường TSB và đạt mật số 9,26  $\log_{10}$ CFU/mL. Sự thay đổi mật số vi khuẩn khi bổ sung thực khuẩn thể vào môi trường nuôi khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng không bổ sung thực khuẩn thể ( $p < 0,05$ ). Mật số vi khuẩn khi tương tác với 6 dòng thực khuẩn thể ΦPVtH; ΦPCK1; ΦPVCT3; ΦPVCT4; ΦPDT4; ΦPDT3 đều giảm rõ rệt, giảm nhiều nhất khi tương tác với thực khuẩn thể ΦPCK1 với mật số vi khuẩn giảm còn 7,22  $\log_{10}$ CFU/mL. Theo [17] 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 ký chủ, kết quả là tiêu diệt tế bào chủ và giải phóng các thực khuẩn thể mới.



Hình 4. Mật số vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sau 24 giờ

Thực khuẩn thể được biết đến là có khả năng kiểm soát vi khuẩn. Dựa trên các kết quả cho thấy sự khác nhau giữa các nghiệm thức đối chứng với nghiệm thức có kết hợp thực khuẩn thể, cũng như sự khác nhau giữa các nghiệm thức có kết hợp thực khuẩn thể là do sự đa dạng của các cách thức sinh sản của thực khuẩn. Theo [18], các thực khuẩn thể “lytic – phân hủy, làm tan” sao chép trong tế bào chủ của chúng và phải làm vỡ tế bào để phóng thích thế hệ tiếp theo. Ở khảo sát khả năng xâm nhiễm vi khuẩn ký chủ cho thấy các dòng thực khuẩn thể ΦPVtH, ΦPCK1, ΦPVCT3

, ΦPVCt4, ΦPDT4, ΦPDT3 đều có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn và đều làm giảm số lượng khuẩn lạc đáng kể so với nghiệm thức đối chứng. Các kết quả được trình bày trong báo cáo này cho thấy nhiều triển vọng về khả năng các thực khuẩn thể có thể tiêu diệt vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* gây bệnh.

#### 4. Kết luận

15 dòng thực khuẩn thể xâm nhiễm *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 với vết tan trong và rõ, trong đó có 6 dòng có khả năng xâm nhiễm *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885. Cả 6 dòng thực khuẩn thể ΦPVtH, ΦPCK1, ΦPVCt3, ΦPVCt4, ΦPDT4, ΦPDT3 đều có khả năng kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và làm giảm mật số vi khuẩn của *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Đây là kết quả đầy triển vọng cho việc ứng dụng thực khuẩn thể kiểm soát 2 loại vi khuẩn *Pseudomonas* sp. và *Vibrio* sp..

#### 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: Mã số: 106.04-2019.335).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] C. de Souza Valente and A. H. L. Wan, "Vibrio and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 181, May 2021, doi: 10.1016/j.jip.2020.107527.
- [2] T. Nakai *et al.*, "Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail," *Dis. Aquat. Org.*, vol. 37, pp. 33-41, 1999, doi: 10.3354/dao037033.
- [3] J. S. Webb, M. Lau, and S. Kjelleberg, "Bacteriophage and Phenotypic Variation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development," *J Bacteriol*, vol. 186, no. 23, pp. 8066-8073, Dec. 2004, doi: 10.1128/JB.186.23.8066-8073.2004.
- [4] R. S. Eriksen, S. L. Svenningsen, K. Sneppen, and N. Mitarai, "A growing microcolony can survive and support persistent propagation of virulent phages," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 2, pp. 337-342, Jan. 2018, doi: 10.1073/pnas.1708954115.
- [5] T. T. B. Van *et al.*, "Effect of bacteriophages and chamber bitter (*Phyllanthus amarus*) in combination on *Vibrio parahaemolyticus*," *J App Biol Biotech*, vol. 11, no. 3, pp. 70-76, Apr. 2023, doi: 10.7324/JABB.2023.91082.
- [6] L. H. B. Ngoc *et al.*, "Effects of Bacteriophages on the Density and Morphology of *Vibrio* spp.," *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol. 20, no. 6, pp. 751-756, 2022.
- [7] Van T. T. B. *et al.*, "Effects of bacteriophages and herbal extract on *Vibrio* spp.," *CTU Journal of Science*, vol. 58, pp. 232-238, Aug. 2022, doi: 10.22144/ctu.jvn.2022.142.
- [8] 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*<sup>TM</sup>, Totowa, NJ: Humana Press, 2009, pp. 69-76, doi: 10.1007/978-1-60327-164-6\_7.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] A. D. Teklemariam *et al.*, "Isolation and Characterization of a Novel Lytic Phage, vB\_PseuP-SA22, and Its Efficacy against Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*," *Antibiotics*, vol. 12, no. 3, 2023, doi: 10.3390/antibiotics12030497.
- [12] H. Kamyab, N. Torkashvand, A. R. Shahverdi, M. R. Khoshayand, M. Sharifzadeh, and Z. Sepehrizadeh, "Isolation, characterization, and genomic analysis of vB\_PaeS\_TUMS\_P81, a lytic

- bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*,” *Virus Genes*, vol. 59, no. 1, pp. 132-141, Feb. 2023, doi: 10.1007/s11262-022-01954-0.
- [13] V. Lertsittikul *et al.*, “A novel virulent Litonavirus phage possesses therapeutic value against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-25576-6.
- [14] G. Xuan, H. Lin, L. Tan, G. Zhao, and J. Wang, “Quorum Sensing Promotes Phage Infection in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1,” *mBio*, vol. 13, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1128/mbio.03174-21.
- [15] Y. Xu, X. Yu, Y. Gu, X. Huang, G. Liu, and X. Liu, “Characterization and Genomic Study of Phage vB\_EcoS-B2 Infecting Multidrug-Resistant *Escherichia coli*,” *Front Microbiol*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00793.
- [16] N. Li *et al.*, “Characterization of Phage Resistance and Their Impacts on Bacterial Fitness in *Pseudomonas aeruginosa*,” *Microbiol Spectr*, vol. 10, no. 5, Oct. 2022, doi: 10.1128/spectrum.02072-22.
- [17] E. Denou, A. Bruttin, C. Barretto, C. Ngom-Bru, H. Brüssow, and S. Zuber, “T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: Potential and problems,” *Virology*, vol. 388, no. 1, pp. 21-30, May 2009, doi: 10.1016/j.virol.2009.03.009.
- [18] J. Doss, K. Culbertson, D. Hahn, J. Camacho, and N. Barekzi, “A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms,” *Viruses*, vol. 9, no. 3, p. 50, Mar. 2017, doi: 10.3390/v9030050.