

HIỆU QUẢ ỨNG DỤNG THỰC KHUẨN THỂ TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH DO VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* GÂY RA TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Trương Thị Bích Vân^{1*}, Nguyễn Thị Cẩm Lý³, Lê Hoàng Bảo Ngọc²,
Phan Trần Học Khang³, Phạm Hoài An³, Trần Văn Bé Năm¹

TÓM TẮT

Vi khuẩn thuộc nhóm *Vibrio* spp. là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng trên tôm, trong đó có các bệnh phổ biến là hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome - AHPNS) và bệnh phân trắng (White Feces Syndrome - WFD). Việc sử dụng kháng sinh để điều trị bệnh làm cho vi khuẩn trở nên đa kháng thuốc. Thực khuẩn thể (bacteriophage) là virus của vi khuẩn, có khả năng ký sinh và tiêu diệt vi khuẩn. Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả của thực khuẩn thể trong điều trị bệnh cho tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Sau 24 giờ chủng thực khuẩn thể (TKT), nước trong bể nuôi từ đục chuyển sang trong. 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 chủng thực khuẩn thể mật số vi khuẩn tiếp tục giảm là $3,3 \times 10^2$ CFU/ml. Kết quả thu được trên mẫu tôm cũng tương tự khi có tác động của thực khuẩn thể vi khuẩn trong gan tụy tôm từ $2,3 \times 10^5$ CFU/con giảm xuống $1,1 \times 10^2$ CFU/con. Hoạt động và hình thái của tôm có sự khác biệt rõ ràng khi tôm nhiễm bệnh và sau khi điều trị. Tôm cảm nhiễm hoạt động chậm chạp, bỏ ăn, lơ lơ gan tụy nhạt màu, ruột rỗng. Chỉ sau hai ngày chủng thực khuẩn thể, tôm bắt đầu ăn lại, gan tụy cũng sậm màu hơn, ruột đầy đặn. Mẫu mô gan tụy tôm chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, có dấu hiệu bong tróc rơi vào lòng ống gan và có hiện tượng melanin hoá các tế bào máu hóa đen xung quanh khu vực hoại tử. Sau khi điều trị bằng thực khuẩn thể cấu trúc hình sao dần phục hồi, không tìm thấy các tế bào máu tụ xung quanh các ống, trong lòng ống giảm các tế bào bong tróc và tế bào máu, không thấy sự melanin hóa. Dựa vào kết quả thu được, có thể nhận định rằng thực khuẩn thể hứa hẹn là một giải pháp sinh học thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh do vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra.

Từ khóa: Thực khuẩn thể, hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (AHPNS), bệnh phân trắng (WFD), *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*.

1. GIỚI THIỆU

Ngành nuôi tôm bao gồm tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) là sản phẩm xuất khẩu chính của thủy sản Việt Nam. Hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome - AHPNS) đang được xem là bệnh phổ biến trên tôm. Ở Việt Nam, bệnh được phát hiện vào năm 2010 và gây thiệt hại đáng kể cho tôm nuôi ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long. Theo Loc Tran *et al.*, 2013, tác nhân gây bệnh AHPNS hoặc hội chứng chết sớm (Early mortality syndrome) được xác định là do chủng vi

khẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ dạ dày tôm bị bệnh hoại tử gan tụy cấp. Việc sử dụng kháng sinh trong phòng trị bệnh đã cho thấy những tác động tiêu cực là vi khuẩn ngày càng kháng thuốc.

Thực khuẩn thể (bacteriophage hay phage) là virus lây nhiễm vi khuẩn, do đó chúng được ứng dụng để kiểm soát các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn. Thực khuẩn thể (TKT) được phát hiện bởi Twort năm 1915 và d'Herralte năm 1917 (Kutter và Sulakvelidze, 2005). Trong nuôi trồng thủy sản, sử dụng TKT là một giải pháp thay thế trong phòng trị bệnh vi khuẩn có tiềm năng đồng thời giảm thiểu tác động đến môi trường và con người. *Vibrio* spp. là một trong những đối tượng ký chủ để nghiên cứu về TKT do sự phân bố rộng rãi và khả năng lây nhiễm rộng trên cả thủy sản và động vật. Một số TKT có hiệu quả đã được thử nghiệm chống lại tác nhân gây bệnh như *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. anguillarum*, và *V. coralliilyticus* đã

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Nghiên cứu sinh ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

³ Học viên cao học ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: ttbvan@ctu.edu.vn

làm tăng tỷ lệ sống sót của các động vật thủy sản. Điều trị sinh học đối với bệnh do *V. harveyi* gây ra đã thành công cho trại giống tôm sú (*Penaeus monodon*) (Vinod *et al.*, 2006) đối với cả hai thử nghiệm điều trị ngắn hạn và dài hạn bằng cách sử dụng TKT thuộc họ *Siphovirus*. Trong các thử nghiệm ngắn hạn (48 giờ), điều trị bằng dịch thực khuẩn ở mức độ bội nhiễm thấp (MOI = 1) cho ấu trùng tôm sú (18 ngày) đã bị nhiễm *V. harveyi* trước đó. Cả hai liều đơn (0 giờ) và liều kép (0 và 24 giờ), đều cho tỷ lệ sống của tôm là 70% và 80% cùng với việc giảm mật độ *V. harveyi*. Ở mẫu đối chứng, kiểm soát mà không xử lý TKT cho thấy tỷ lệ sống chỉ 25% và tăng mật số *V. harveyi*. Kalatzis P. G. *et al.*, (2017) đã mô tả quy trình chuẩn bị một loại hỗn hợp TKT và áp dụng chúng vào việc kiểm soát nhiễm trùng do vi khuẩn gây ra trên tôm. Kết quả cho thấy *Va-F3* có hiệu quả cao trong việc ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh hơn bất kỳ TKT đơn lẻ nào khác trong ống nghiệm. Kết quả khi đánh giá hiệu quả của TKT trong việc bảo vệ tôm chống lại *Vibrio* sp. cho thấy tỷ lệ sống của tôm có thể đạt 91,4% so với nhóm không được xử lý *Va-F3* chỉ là 20,0%.

Tại Việt Nam đã có một số nghiên cứu về ứng dụng TKT điều trị bệnh cho thủy sản như TKT ức chế vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây bệnh cho cá tra. Hai dòng TKT *A. hydrophila*-TKT 2 và *A. hydrophila*-phage 5 phân lập từ các mẫu nước sông Sài Gòn, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam thuộc họ Myoviridae có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn *Aeromonas* đa kháng thuốc. Số lượng thực khuẩn sinh ra sau 1 vòng đời là 213 PFU/tế bào ký chủ. Nghiên cứu này đã cho thấy tiềm năng sử dụng TKT như một phương pháp sinh học hiệu quả để kiểm soát vi khuẩn *Aeromonas* spp. trong các trang trại (Tuan Son Le *et al.*, 2018).

Các nghiên cứu trước đây được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, đã phân lập được 22 dòng TKT từ nước ao nuôi tôm và nước biển ở huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu. Tất cả các dòng TKT đều có khả năng xâm nhiễm vi khuẩn *Vibrio* spp. Đặc biệt 3 dòng TKT ϕ NB2, ϕ NB10 phân lập từ nước biển và ϕ V12 từ nước ao nuôi tôm có khả năng làm giảm số lượng vi khuẩn 59,66%, 58,15% và 90,15% sau 72 giờ trong điều kiện phòng thí nghiệm (Nguyễn Hoàng Vũ, 2019; Nguyễn

Bích Ngọc, 2019). Từ kết quả trên, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu là xác định khả năng điều trị bệnh của TKT trên mô hình tôm (*Litopenaeus vannamei*) đã bị cảm nhiễm gây bệnh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nguồn vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* đã được định danh và dòng thực khuẩn thể ϕ V12 do Phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp.

Nguồn tôm (giai đoạn 30 – 45 ngày tuổi) được các trại nuôi thâm canh tại tỉnh Sóc Trăng và Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị tôm gây cảm nhiễm và điều trị bằng thực khuẩn thể

Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) có khối lượng khoảng 1- 1,5 g được nuôi trong nước biển với độ mặn 15‰. Nước nuôi tôm được khử trùng bằng chlorine (nồng độ 30 ppm), sục khí liên tục để loại chlorine. Tôm được cho vào bể thí nghiệm ổn định ít nhất 72 giờ trước khi chủng vi khuẩn. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Jun *et al.* (2017) và Sarmila *et al.* (2019), cụ thể như sau: mỗi đơn vị thí nghiệm được bố trí trong bể có dung tích 30 lít, mỗi bể là 30 con tôm với 3 bể nuôi. Bể 1: Không chủng vi khuẩn (nuôi dưỡng tôm khỏe) (-); Bể 2: Chủng vi khuẩn (cảm nhiễm bệnh) (+); Bể 3: Điều trị bằng thực khuẩn thể sau khi tôm có triệu chứng bệnh rõ ràng. Vi khuẩn được chủng lần lượt vào môi trường nước nuôi tôm để tránh hiện tượng tôm bị sốc, đến khi kiểm tra mật số vi khuẩn trong tôm đạt $10^5 - 10^6$ CFU/mL. Đây là mật số để cảm nhiễm tôm theo nghiên cứu của Nguyễn Trọng Nghĩa và *ctv.* (2015); Trần Minh Long và Phạm Thị Hoa (2018). Khi tôm xuất hiện các dấu hiệu bệnh lý thì tiến hành chủng TKT vào nước nuôi điều trị với liều lượng 2 ml với mật số 2×10^6 PFU/mL. Thí nghiệm được theo dõi trong thời gian 21 ngày sau cảm nhiễm. Chỉ tiêu ghi nhận về chất lượng nước, các chỉ tiêu về mật số vi khuẩn, màu nước, độ đục của nước trước khi chủng khuẩn và sau điều trị; theo dõi chỉ tiêu sinh trưởng như kích thước, cân nặng và khả năng hoạt động của tôm; theo dõi dấu hiệu bệnh lý, phân tích mô học cơ quan gan tụy. Hình thái mô học của tôm trước khi chủng khuẩn, chủng khuẩn và sau điều trị. Giải phẫu mô bệnh học tôm trước khi chủng khuẩn, chủng khuẩn và sau điều trị.

2.2.2. Phương pháp xác định mật số vi khuẩn trong nước và mẫu tôm

Đối với mẫu nước: mật số vi khuẩn trong nước được theo dõi liên tục mỗi ngày thông qua số lượng khuẩn lạc trên đĩa petri bằng phương pháp trải đếm trên môi trường TCBS. Lấy nước ở 3 bể cho vào 3 ống eppendorf 1ml đã đánh số từ 1 đến 3. Dùng micropipette rút 100 μ l nước mỗi ống cho vào 3 đĩa petri có chứa môi trường TCBS agar đã đánh số thứ tự từ 1 đến 3 và thực hiện phương pháp cấy trải. Sau 24 giờ tiến hành đếm tổng số khuẩn lạc có trên đĩa rồi nhân cho 10 sẽ xác định được mật số vi khuẩn trong nước (CFU/ml).

Đối với mẫu tôm: mật số vi khuẩn trong tôm cũng được theo dõi liên tục mỗi ngày thông qua số lượng khuẩn lạc trên đĩa petri bằng phương pháp trải đếm trên môi trường TCBS. Mẫu tôm bể 1: Không chủng vi khuẩn được thu sau khi thả vào bể 1 ngày; mẫu tôm bể 2: Chỉ chủng vi khuẩn (cảm nhiễm bệnh) được thu sau 3 giờ ở các thời điểm chủng khuẩn lần 3, lần 5 và lần 6; mẫu tôm bể 3: Điều trị bằng TKT sau khi tôm có triệu chứng bệnh rõ ràng được thu sau 1 ngày chủng TKT. Mỗi thí nghiệm sử dụng 1 con tôm. Mẫu tôm sau khi thu sẽ được lau khô sau đó cắt nhỏ mẫu cho vào ống falcon có chứa 10 ml nước cất vô trùng. Dùng micropipette rút 100 μ l nước trong ống cho vào đĩa petri có chứa môi trường TCBS agar và thực hiện phương pháp cấy trải. Sau 24 giờ, đếm tổng số khuẩn lạc có trên đĩa rồi nhân cho 10 sau đó nhân cho hệ số pha loãng (10 ml/con) sẽ xác định được mật số vi khuẩn trong tôm (CFU/con).

2.2.3. Phương pháp mô học

Phương pháp mô học được sử dụng để xác định và so sánh mô tôm của các thí nghiệm ở 3 nghiệm thức. Mỗi thí nghiệm sử dụng 3 con tôm. Mẫu tôm bể 1: Không chủng vi khuẩn được thu sau khi thả vào bể 2 ngày, mẫu tôm bể 2: Chỉ chủng vi khuẩn (cảm nhiễm bệnh) được thu khi tôm có triệu chứng bệnh rõ ràng và đạt mật số vi khuẩn gây bệnh, mẫu tôm bể 3: Điều trị bằng TKT sau khi tôm có triệu chứng bệnh rõ ràng được thu sau 4 ngày chủng TKT. Mẫu tôm sau khi lấy khối gan tụy và ruột ra được cố định trong dung dịch Davidson's AFA (theo tỉ lệ 1 phần cơ/10 phần dung dịch Davidson's) trong khoảng 48 giờ sau đó tiến hành rửa dưới vòi nước chảy nhẹ ít nhất 12 giờ (Vũ Công Hòe, 1976). Mẫu được tiếp tục xử lý qua các bước khử nước với các

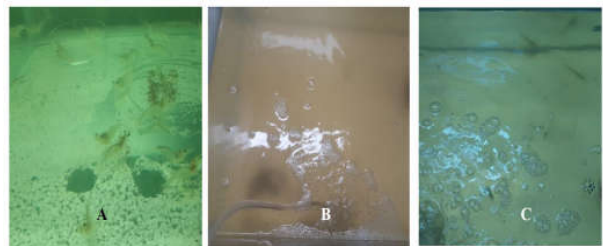
nồng độ cồn tăng dần từ cồn 50⁰, 60⁰, 70⁰, 80⁰, 90⁰, cồn tuyệt đối, n- Butanol; sau đó mẫu được làm trong bằng xylen, rồi tiếp tục tẩm trong paraffin và sáp ong nóng chảy trong tủ sấy ở 60⁰C. Mẫu được đem đúc khối và sau ít nhất 24 giờ sẽ được cắt lát, dán lên lame và nhuộm với thuốc nhuộm haematoxylin và eosin (H&E). Tiêu bản được quan sát và chụp hình tiêu bản đặc trưng dưới kính hiển vi Primo Star Carl Zeiss của Đức với các vật kính 10X, 40X.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát khả năng điều trị bệnh trên tôm sau sử dụng liệu pháp thực khuẩn thể (TKT)

3.1.1. Chất lượng nước nuôi trước khi chủng khuẩn, chủng khuẩn và sau điều trị

Màu nước nuôi thay đổi rõ rệt từ lúc chưa chủng khuẩn có màu nước trong thấy được đáy bể và hoạt động bơi lội của tôm với OD 0,037 (Hình 1A), sau khi chủng vi khuẩn nước dần chuyển sang đục cho đến khi không còn nhìn thấy đáy bể nữa với chỉ số OD 0,11 (Hình 1B). Sau khi chủng TKT vào bể điều trị 1 ngày thì có chuyển biến rõ rệt nước trong trở lại với chỉ số OD 0,008 (Hình 1C). Độ đục của nước là do nhiều yếu tố tạo nên như mật độ vi khuẩn tăng lên, thức ăn dư thừa do tôm bỏ ăn, vỏ tôm lột, xác tôm chết, chất thải của tôm...trong đó yếu tố chính là liên quan mật số vi khuẩn trong nước. Sau khi chủng TKT vào bể nuôi, đã làm giảm lượng vi khuẩn có trong bể nên màu nước trở nên trong hơn.

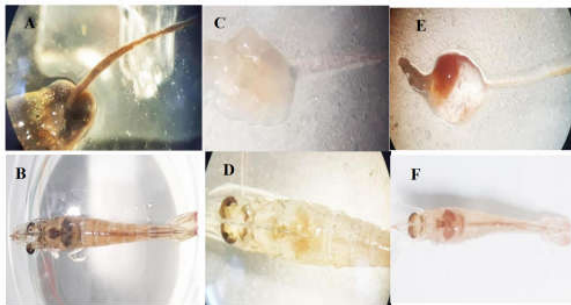


Hình 1. Màu nước trong bể nuôi tôm trước chủng khuẩn (A), sau chủng khuẩn (B) và sau điều trị bằng TKT (C)

3.1.2. Dấu hiệu bệnh lý tôm trước khi chủng khuẩn, sau chủng khuẩn và sau điều trị

Tôm sử dụng cho thí nghiệm là tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) có khối lượng trung bình khoảng 1-1,5 g/con, khỏe mạnh, hoạt động nhanh nhẹn, ăn nhanh và hết thức ăn theo khẩu phần. Tôm có màu sắc sáng, phản ứng nhanh, không có tổn thương bên ngoài, gan tụy sậm màu, ruột đầy

(Hình 2A và 2B). Sau khi cảm nhiễm vi khuẩn, tôm xuất hiện các dấu hiệu bệnh lý tương tự trong mô tả của (Nguyễn Trọng Nghĩa và ctv, 2015) được trích dẫn từ Lightner *et al.* (2012). Tôm bệnh hoại tử gan tụy trong bể nuôi thường có một số các dấu hiệu như tôm chết đáy, bỏ ăn, gan tụy nhạt màu, ruột rỗng và có hiện tượng mềm vỏ. Tôm nuôi có thể chết đột ngột với tỉ lệ cao trong thời gian ngắn sau khi xuất hiện các dấu hiệu bệnh đặc biệt khoảng sau 2-3 ngày (Lê Hồng Phước và ctv., 2013).



Hình 2. Dấu hiệu bệnh lý của tôm khỏe, tôm cảm nhiễm bệnh và tôm hồi phục

(A/B): Dấu hiệu bên ngoài và gan tụy của tôm trước chủng khuẩn (tôm khỏe)

(C/D): Dấu hiệu bên ngoài và gan tụy của tôm sau chủng khuẩn (tôm bệnh)

(E/F): Dấu hiệu bên ngoài và gan tụy của tôm sau điều trị (tôm hồi phục)

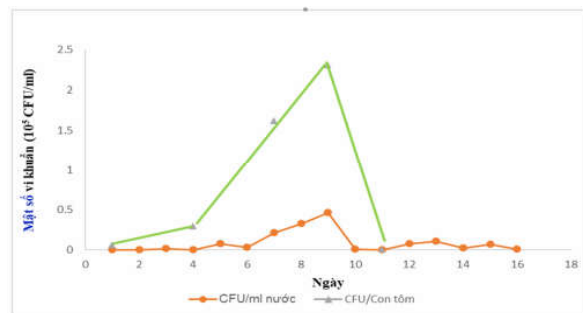
Sau khi vi khuẩn cảm nhiễm đạt mật số gây bệnh, tôm bắt đầu hoạt động chậm chạp, bỏ ăn, lơ đãng và tấp mé. Lượng thức ăn ghi nhận được giữa bốn chủng bệnh với bốn tôm khỏe (đối chứng) có sự khác biệt rõ rệt. Số lượng tôm như nhau, cùng 1 lượng thức ăn cho vào như nhau (5% khối lượng cơ thể), kết quả cho thấy thức ăn bốn bệnh còn rất nhiều trong khi bốn khỏe thì hết. Các bể nuôi cảm nhiễm ghi nhận lượng tôm chết đáy tăng lên, tôm còn có hiện tượng mềm vỏ. Khi quan sát dưới kính soi nổi thấy gan tụy nhạt màu, ruột rỗng (Hình 2C và 2D).

Tiến hành điều trị bằng TKT khi tôm nhiễm bệnh và số lượng tôm chết 50%. Sau 24 giờ chủng TKT vào bốn điều trị quan sát thấy tôm bắt đầu ăn lại, bớt tấp mé. Khi quan sát dưới kính hiển vi thấy gan tụy hồi phục dần, sậm màu hơn, ruột đầy do tôm đã ăn lại (Hình 2E và 2F).

3.1.3. Sự tương quan mật số vi khuẩn trong nước và trong gan tụy của tôm sau khi cảm nhiễm

Mẫu nước nuôi tôm được xử lý và kiểm tra trước khi thả tôm vào ít nhất một tuần. Sau khi thả tôm vào

bể vẫn có vi khuẩn nhưng mật số thấp $3,1 \times 10^2$ CFU/ml trước khi cảm nhiễm. Sau khi cảm nhiễm, số lượng khuẩn lạc tăng dần từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 9 sau cảm nhiễm đạt mật số $4,6 \times 10^4$ CFU/ml. Trong khi đó trong con tôm, gan tụy và ruột tôm mật số vi khuẩn tăng lên nhanh chóng trước cảm nhiễm 6×10^3 CFU/ml. Sau cảm nhiễm, số lượng vi khuẩn tăng nhanh từ $2,95 \times 10^4$ CFU/con, $1,6 \times 10^5$ CFU/con, đạt mật số cao nhất là $2,3 \times 10^5$ CFU/con (Hình 3). Tại thời điểm này tôm biểu hiện các dấu hiệu bệnh lý rõ rệt, bỏ ăn và số lượng tôm chết tăng dần. Ngày thứ 10, tiến hành chủng TKT để điều trị bệnh. Chỉ sau 24 giờ chủng TKT vào nước nuôi tôm, số lượng khuẩn lạc giảm mạnh, mật số vi khuẩn đạt ngưỡng cao nhất qua 6 lần chủng vi khuẩn liên tiếp ($4,6 \times 10^4$ CFU/ml) và giảm mạnh sau một ngày chủng TKT ($6,5 \times 10^2$ CFU/ml). Sau hai ngày chủng TKT, mật số vi khuẩn lại tiếp tục giảm mạnh đến $3,3 \times 10^2$ CFU/ml gần bằng với mật số vi khuẩn trong nước trước khi cảm nhiễm là $3,1 \times 10^2$ CFU/ml. Mật số vi khuẩn trong nước được tiếp tục theo dõi 6 ngày sau điều trị bằng TKT vẫn duy trì ở mức thấp. Trong khi đó, đối với tôm từ mật số vi khuẩn $2,3 \times 10^5$ CFU/con sau 24 giờ điều trị bằng TKT giảm xuống nhanh chóng còn $1,1 \times 10^3$ CFU/con. Tôm bắt đầu hoạt động nhanh nhẹn và ăn lại. Điều này cho thấy TKT có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và có tác dụng điều trị hội chứng gan tụy cấp tính cho tôm (Hình 3).

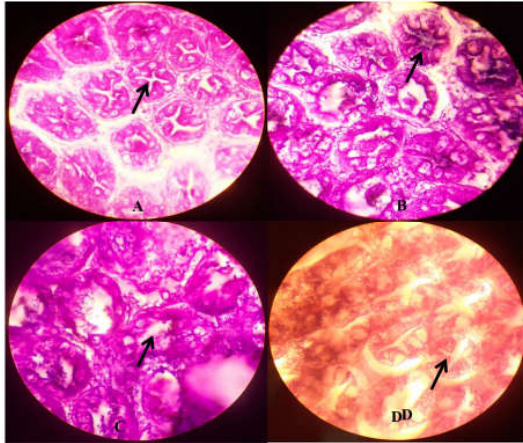


Hình 3. Đồ thị diễn biến mật số vi khuẩn cảm nhiễm từ nước nuôi tôm và trong gan tụy ruột tôm trước, sau cảm nhiễm và sau khi chủng thực khuẩn thể điều trị

Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Carlos và Sergio (2014). Bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cảm nhiễm cho tôm con với mật số 2×10^6 CFU/ml. Ấu trùng bị nhiễm bệnh được xử lý bằng các liều lượng khác nhau của TKT. Kết quả cho thấy các TKT A3S và Vpms1 có hiệu quả giảm tỷ lệ

chết do *V. parahaemolyticus* gây ra cho tôm con. Nghiên cứu này cung cấp cơ sở cho việc sử dụng TKT trong việc kiểm soát vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh cho tôm.

3.2. Giải phẫu mô bệnh học tôm trước khi chủng khuẩn, chủng khuẩn và sau điều trị



Hình 4. Mô gan tụy tôm được chụp dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40X

(A) Mô gan tụy tôm không cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (-).

(B) Mô gan tụy tôm cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có dấu hiệu hoại tử mức 1.

(C) Mô gan tụy tôm cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có dấu hiệu hoại tử mức 2.

(D) Mô gan tụy tôm hồi phục khi sau điều trị bằng thực khuẩn thể hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính do vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Theo Lightner *et al.* (2012), diễn biến về bệnh lý học của hội chứng hoại tử gan tụy là tình trạng thoái hóa cấp tính của gan tụy kèm theo sự giảm hoạt động của tế bào như rối loạn chức năng của các tế bào B (vesicular cells), F (fibril cells) và tế bào R (reabsorption cells); tế bào E (embryonic cells) có sự hư hại về chức năng, thể hiện qua mức độ phân bào bị suy giảm rõ rệt và nhân tế bào kết đặc, trương to; các tế bào bị bong tróc và rơi vào lòng ống gan tụy (dạng hoại tử 1) và giai đoạn cuối là sự tập trung của các tế bào máu ở giữa ống gan tụy và nhiễm khuẩn thứ cấp kèm theo hiện tượng melanin hóa (dạng hoại tử 2).

Phân tích mô học trên mẫu tôm không cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, sát mặt cắt ngang, vùng gan tụy tôm bình thường với các lòng ống (lumen) có cấu trúc hình sao, không có sự bong tróc của các tế bào (Hình 4A)

Các đặc điểm mô gan tụy khi tôm bị nhiễm *V. parahaemolyticus* cũng tương tự với các nghiên cứu của Lightner *et al.* (2012), Flegel (2012), Joshi *et al.* (2014), Trần Thị Tuyết Hoa *et al.* (2014), Trần Lưu Khoang *et al.* (2019), Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh (2019) và Aguilar-Rendón *et al.* (2020) mô tả chi tiết đặc điểm mô bệnh học đặc trưng của bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Khi quan sát dưới kính hiển vi thấy được các dấu hiệu mức hoại tử 1 với các đặc điểm, không còn cấu trúc hình sao. Các tế bào gan tụy bị thoái hóa tạo thành các đám hỗn độn với nhiều hình thù khác nhau, một số tế bào có nhân trương to và tế bào chất bắt màu thuốc nhuộm đậm hơn, ống teo có sự bong tróc của gan tụy và sự thâm nhiễm tế bào máu trong lòng ống (Hình 4B). Đối với mức hoại tử 2, cấu trúc ống gan tụy hoàn toàn biến mất không phân biệt được các hình dạng tế bào (Hình 4C). Bên cạnh đó, có sự xuất hiện của vô số tế bào máu bao bọc xung quanh khối hoại tử. Bên trong khối hoại tử là các tế bào chết có lẫn các tế bào máu.

Sau điều trị bằng TKT dấu hiệu cho thấy cấu trúc mô dần hồi phục, một số mô bắt đầu có lại cấu trúc hình sao số tế bào bong tróc và tế bào máu trong lòng ống giảm đáng kể và đặc biệt không thấy sự melanin hóa (Hình 4D). Các kết quả này cho thấy TKT có khả năng điều trị hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và qua hình ảnh mô học cho thấy thực khuẩn thể có khả năng hồi phục một số tế bào gan tụy bị tổn thương do nhiễm khuẩn.

Khả năng ức chế vi khuẩn của TKT được xác định rõ ràng. Sau 24 giờ chủng TKT, 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, mật số vi khuẩn trong gan tụy tôm từ $2,3 \times 10^5$ CFU/con giảm xuống $1,1 \times 10^2$ CFU/con. Về khả năng hồi phục của tôm, sau hai ngày chủng TKT, tôm bắt đầu ăn lại, gan tụy cũng sậm 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. Nghiên cứu này cho thấy 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 (*Litopenaeus vannamei*).

4. KẾT LUẬN

Thực khuẩn thể có khả năng làm giảm lượng vi khuẩn trong nước và trong con tôm sau 24 giờ điều trị qua đó giúp tôm bệnh hồi phục chức năng và hoạt động trở lại. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy

liệu pháp thực khuẩn thể hứa hẹn cho việc ứng dụng như là kháng sinh sinh học trong việc điều trị bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hoàn thành với sự hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở của Trường Đại học Cần Thơ (Mã số đề tài: T2020-111).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aguilar-Rendón, K. G., R Lozano-Olvera, B Yáñez-Rivera and S A Soto-Rodriguez, 2020. Bacteriological and histopathological analysis of *Penaeus vannamei* experimentally infected with *Vibrio parahaemolyticus*-AHPND strains. Dis Aquat Organ. 140:167-177. doi: 10.3354/dao03503.
2. Carlos O Lomeli-Ortega and Sergio F Martínez-Díaz, 2014. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. Aquaculture. 434: 208-211
3. Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. Journal of Invertebrate Pathology 110:166-173.
4. Joshi, J., Srisala, J.; Sakaew, W., Prachumwat, A., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W. and Thitamadee, S., 2014. Identification of bacterial agent (s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. S J Sci Tech, 21, 315-320, <https://doi.org/10.14456/sjst.2014.33>.
5. Jun, J. W., Jee Eun Han, Sib Sankar Giri, Kathy F. J. Tang, Xiaohui Zhou, Luis Fernando Aranguren, Hyoun Joong Kim, Saekil Yun, Cheng Chi, Sang Guen Kim and Se Chang Park¹, 2018. Phage Application for the Protection from Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei*. Indian J Microbiol 58(1):114-117.
6. Kutter and Sulakvelidze, 2005. Bacteriophage: biology and application. CRC Press. The United State. 450pp.
7. Lê Hồng Phước, Nguyễn Thị Hiền, Võ Hồng Phương, Nguyễn Phạm Hoàng Huy, Ngô Thị Bích Phương và Nguyễn Trung Hiếu, 2013. Độc lực của các chủng *Vibrio* đối với tôm sú và tôm thẻ chân trắng. Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long, số 2.
8. Loc Tran, Linda Nunan, Rita M. Redman, Leone L. Mohney, Carlos R. Pantoja, Kevin Fitzsimmons and Donald V. Lightner., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of aquatic organisms. Vol. 105: 45-55, 2013, doi: 10.3354/dao02621.
9. Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L. and Tran, L., 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Global Aquaculture Advocate, January/February, 40.
10. Nguyễn Trọng Nghĩa, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú và Phạm Anh Tuấn, 2015. Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm nuôi ở Bạc Liêu. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ, 39: 99-107.
11. Nguyễn Hoàng Vũ, 2019. Phân lập thực khuẩn thể từ nước biển và đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên thủy sản trong điều kiện *in vitro*. Luận văn đại học ngành Vi sinh vật học, khóa 41, Trường Đại học Cần Thơ.
12. Nguyễn Bích Ngọc, 2019. Phân lập thực khuẩn thể từ nước ao nuôi tôm có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. ở huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu. Luận văn đại học ngành Vi sinh vật học, khóa 41, Trường Đại học Cần Thơ.
13. Kalatzis, P. G., Nanna Rørbo, Daniel Castillo, Jesper Juel Mauritzen, Jóhanna Jørgensen, Constantina Kokkari, Faxing Zhang, Pantelis Katharios and Mathias Middelboe, 2017. Stumbling across the Same Phage: Comparative Genomics of Widespread Temperate Phages Infecting the Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. Viruses, 9: 122-19.
14. Sarmila, M., Tom Defoirdt (UGent), M. Y. Ina-Salwany, Fatimah Md Yusoff, Mohamed Shariff, Siti Izera Ismail and I. Natrah, 2019. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. Aquaculture. 511.
15. Trần Lưu Khoang, Ngô Chí Nguyên, Trương Quốc Phú và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2019. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự miễn dịch của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. Tập 56, số chuyên đề: Thủy sản (2020)(1): 38-44.
16. Trần Minh Long và Phạm Thị Hoa, 2018. Bước đầu đánh giá khả năng loại trừ vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (ahpnd) *Vibrio*

parahaemolyticus bằng phương pháp sử dụng hệ sợi nấm trong hệ thống nuôi tôm. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. Doi:10.22144/ctu.jsi.2018.040.

17. Tuan Son Le, Thi Hien Nguyen, Hong Phuong Vo, Van Cuong Doan, Hong Loc Nguyen, Minh Trung Tran, Trong Tuan Tran, Paul C Southgate, D İpek Kurtböke, 2018. Protective Effects of Bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* Species Causing Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS) in Striped Catfish. *Antibiotics* 16.

18. Trần Thị Tuyết Hoa, Phạm Thị Thanh Phương, Đỗ Thị Thanh Hương và Nguyễn Thanh Phương, 2014. Tác động của cypermethrin và nhiệt độ lên biến đổi mô gan tụy tôm sú (*Penaeus monodon*). *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần*

Thơ. Tập 56, số chuyên đề: Thủy sản (2020)(1): 38-44.

19. Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2019. Ảnh hưởng oxytetracyclin lên đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cảm nhiễm *Vibrio parahaemolyticus*. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. Tập 55, số 4B (2019): 148-154.

20. Vinod, M. G., Shivu M. M., Umesha K. R., Rajeeva B. C., Krohne G., Indrani Karunasagar and Iddya Karuna, 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255 (1-4): 117-124.

21. Vũ Công Hòe, Vi Huyền Trác và Nguyễn Vương, 1976. Kỹ thuật nuôi vi thông thường. Nxb. Y học, Hà Nội.

EFFECTIVE APPLICATION OF BACTERIOPHAGES IN THE TREATMENT OF DISEASES CAUSED BY *Vibrio parahaemolyticus* ON WHITE LEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

**Trương Thị Bích Van^{1*}, Nguyễn Thị Cam Ly², Lê Hoàng Bao Ngọc²,
Phan Trần Học Khang³, Phạm Hoài An³, Trần Văn Be Nam¹**

¹*Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University*

²*PhD student major Biotechnology*

³*Master student major Biotechnology*

^{*}*Email: ttbvan@ctu.edu.vn*

Summary

Bacteria *Vibrio* spp. is the causative agent of disease in shrimp, in which the common diseases are acute necrotic syndrome (Acute hepatopancreatic necrosis syndrome - AHPNS) and white feces disease (white feces syndrome - WFD). The usage of antibiotics to treat diseases makes bacteria multi-resistant. A bacteriophage is a virus of bacteria that it has the ability to infect and kill bacteria. This research evaluates the efficiency of bacteriophages in the treatment of white leg shrimps (*Litopenaeus vannamei*) disease. After 24 hours of bacteriophage inoculation, the water in the culture tank changed from cloudy to clear. The density of bacteria in the water decreased clearly from 4.6×10^4 CFU/ml to 6.5×10^2 CFU/ml and after two days of phage inoculation, the bacterial density continued to decline to 3.3×10^2 CFU/ml. The results on shrimp samples were similar with the effect of bacteriophages, bacteria in the hepatopancreas of shrimps decreased from 2.3×10^5 CFU/individual to 1.1×10^2 CFU/individual. The activities and morphology of shrimp were clearly different when shrimps were infected and treated. Infected shrimps worked slowly, stopped eating, leaden, empty intestines, pale hepatopancreas. But after only two days of inoculation with bacteriophages, shrimp began to eat again, hepatopancreas also darker, intestines gradually filled. The hepatopancreas tissue samples of shrimps were infected by *Vibrio parahaemolyticus*, the cells had signs of peeling and falling into the lumen of the hepatopancreatic duct lumen and the phenomenon of melanization due to the blackening of blood cells around the necrotic area. After bacteriophage treatment, the stellate structure gradually recovered, the blood cells were not found around the tubules, in the lumen of the tubules reduced peeling cells and blood cells, the melanization was not observed. Based on these results, it can be recognized that phages are a biological solution to replace antibiotics in the disease prevention.

Keywords: *Acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), bacteriophage, Litopenaeus vannamei, Vibrio parahaemolyticus, white feces syndrome - WFD).*

Người phản biện: PGS.TS. Tô Long Thành

Ngày nhận bài: 16/7/2021

Ngày thông qua phản biện: 18/8/2021

Ngày duyệt đăng: 25/8/2021