

KHẢO SÁT SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA THỰC KHUẨN THỂ ĐẾN VI KHUẨN *Citrobacter* spp. PHÂN LẬP TỪ NƯỚC AO TÔM

Trương Thị Bích Vân¹, Lê Thị Cẩm Tú¹, Hà Thị Bảo Trân¹,

Lê Anh Gia Huy¹, Nguyễn Phạm Anh Thi^{1,*}

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: npathi@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Citrobacter spp. là vi khuẩn cơ hội gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản và là chủng vi khuẩn đa kháng thuốc đang được quan tâm hiện nay. Để giải quyết vấn đề này một cách hiệu quả và an toàn, việc tìm kiếm các biện pháp thay thế kháng sinh đang trở nên cấp thiết. Hiện nay, sử dụng thực khuẩn thể là biện pháp sinh học đầy tiềm năng thay thế kháng sinh để điều trị các bệnh do vi khuẩn gây ra. Do đó, nghiên cứu “Khảo sát sự ảnh hưởng của thực khuẩn thể đến vi khuẩn *Citrobacter* spp. phân lập từ nước ao tôm” được thực hiện. Kết quả nghiên cứu phân lập vi khuẩn từ nước ao tôm được định danh là *Citrobacter freundii* bằng kỹ thuật giải mã trình tự vùng 16S rDNA và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI. Từ các mẫu tôm bệnh, nước và bùn đáy ao tôm đã phân lập được 58 dòng thực khuẩn thể. Bằng phương pháp agar hai lớp đã tuyển chọn được 6 dòng thực khuẩn thể là: φTb, φBAM2, φBAM1, φVH3, φDH2 và φDH3 có khả năng lây nhiễm vào vi khuẩn *Citrobacter freundii*. Trong đó, dòng thực khuẩn thể φDH3 đã thể hiện vết tan rõ ràng và trong suốt nhất trên nền vi khuẩn *Citrobacter freundii*. Thực khuẩn thể φDH3 được chọn để đánh giá khả năng ảnh hưởng của chúng lên mật số vi khuẩn và hình thái khuẩn lạc *Citrobacter freundii* bằng phương pháp trải đếm. Kết quả đánh giá cho thấy, dòng thực khuẩn thể φDH3 làm giảm mật số vi khuẩn và đồng thời làm thay đổi về hình thái khuẩn lạc vi khuẩn *Citrobacter freundii*.

Từ khóa: *Citrobacter* spp., thực khuẩn thể, phương pháp agar hai lớp, vết tan.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi trồng thủy sản là một trong những ngành kinh tế mũi nhọn có nhiều cơ hội phát triển ở thế giới và Việt Nam. Tại Việt Nam, nghề nuôi trồng thủy sản đã mang lại thu nhập lớn cho người dân và đóng góp quan trọng cho nền kinh tế. Tuy nhiên, trong quá trình canh tác, người dân vẫn còn gặp không ít khó khăn về môi trường nuôi, ô nhiễm nguồn nước... do các vi sinh vật có hại gây ra như: Vi khuẩn *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Desulfovibrio* spp., *Citrobacter* spp., *Aeromonas* spp.

Citrobacter spp. là nguyên nhân gây nhiễm trùng cho cá và các loài thủy sản khác. *Citrobacter* spp. phân bố rộng rãi trong tự nhiên và là mầm bệnh gây bệnh cho người và động vật thủy sản [1]. Trong số các loài *Citrobacter* được báo cáo là gây

bệnh ở động vật thủy sản có *Citrobacter braakii* và *Citrobacter freundii*, những loài này gây bệnh nhiễm trùng huyết, viêm ruột nặng, tổn thương thận và mang của cá da trơn. Đối với cá chép, lươn, cá đuối nước ngọt và tôm, loài này gây bệnh viêm dạ dày ruột xuất huyết và xuất hiện các khối u ở gan và lách [2]. Bên cạnh đó, *Citrobacter* cũng liên quan đến các trường hợp nhiễm trùng huyết xảy ra trên người, chúng có thể gây viêm màng não và nhiễm trùng phổi ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Nhiễm trùng do *Citrobacter* spp. có thể gây tử vong với tỷ lệ tử vong chung ước tính khoảng 33 - 48%, bao gồm tỷ lệ tử vong 30% đối với trẻ em. Đối tượng dễ mắc bệnh nhất là trẻ em, người bị suy giảm miễn dịch và người già [3]. Do đó, vi khuẩn này được coi là một vấn đề quan trọng đối với sức khỏe cộng

đồng và là mầm bệnh cơ hội trong việc nuôi trồng thủy hải sản.

Trước tình hình đó, để điều trị các bệnh do *Citrobacter* spp. và các vi sinh vật khác gây ra, người ta thường sử dụng các biện pháp như: Thuốc kháng sinh, thuốc hóa học, các loại chế phẩm sinh học, trong đó thuốc kháng sinh được sử dụng một cách rộng rãi. Tuy nhiên, việc lạm dụng kháng sinh dẫn đến sự xuất hiện nhóm vi sinh vật kháng kháng sinh, điều này là một vấn đề nghiêm trọng và cho thấy cần có các chiến lược điều trị, phòng ngừa thay thế. Thực khuẩn thể (TKT – bacteriophage) là một trong những liệu pháp đã và đang được nghiên cứu để thay thế cho kháng sinh được phân lập từ môi trường tự nhiên. Các TKT có những đặc tính đa dạng an toàn và thân thiện với môi trường [4]. Nhiều nghiên cứu đã xác định hiệu quả của việc sử dụng TKT giúp tôm, cá tăng trưởng tốt, tăng cường hệ miễn dịch và ức chế vi khuẩn gây bệnh [5]. Madurantakam Royam và Nachimuthu (2020) [1] đã sử dụng TKT MRM19 và MRM57 làm tác nhân kiểm soát sinh học ức chế *Citrobacter* spp. trên cá ngừ vằn. Oliveira và cs (2016) [6] đã sử dụng TKT vB_CfrM_CfP1 để kiểm soát các bệnh nhiễm trùng trên người do *Citrobacter freundii* gây ra. Vì vậy, nghiên cứu “*Khảo sát sự ảnh hưởng của thực khuẩn thể đến vi khuẩn Citrobacter spp. phân lập từ nước ao tôm*” được thực hiện với mục tiêu tìm ra các dòng TKT có khả năng ức chế bệnh trong nuôi trồng thủy sản.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

TKT được phân lập từ nước ao nuôi tôm, bùn đáy ao và tôm bệnh tại tỉnh Sóc Trăng, Kiên Giang và thành phố Cần Thơ.

Vi khuẩn *Citrobacter* spp. được phân lập từ mẫu nước và bùn đáy ao tôm tại tỉnh Kiên Giang, Sóc Trăng và thành phố Cần Thơ.

Hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu: Môi trường TSB (Tryptone Soya Broth - Ấn Độ), môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose

Agar – Ấn Độ), XLD (Xylose Lysine Deoxycholate Agar - Ấn Độ), môi trường TSA (Tryptone Soya Agar – Ấn Độ).

Thời gian thực hiện: Từ tháng 6/2023 – 02/2024.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập và nhận diện các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa vi khuẩn

Từ 80 mẫu nước ao nuôi tôm, bùn đáy ao và tôm bệnh được lọc để phân lập vi khuẩn và TKT. Lấy 7 mL mẫu nước ao nuôi và 13 mL môi trường TSB (Tryptone Soya Broth) vào ống falcon để qua đêm nhằm tăng sinh khuẩn. Rút 100 μ L mẫu trải trên môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar). Sau 24 giờ, chọn những khuẩn lạc tròn, màu đen đặc trưng để tiếp tục cấy ròng. Vi khuẩn được nhận diện bằng các chỉ tiêu sinh lý và sinh hóa, như: Catalase, oxidase, nhuộm Gram, tính di động, khả năng sinh khí H₂S được thực hiện theo mô tả của Truong Thi Bich Van và Tran Vo Minh Thu (2023) [7].

2.2.2. Nhận diện vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Quá trình ly trích ADN vi khuẩn được thực hiện theo mô tả của Gupta (2019) [8] và vi khuẩn được xác định bằng cách khuếch đại trình tự 16S rDNA với cặp mồi xuôi 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') và mồi ngược 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). Phản ứng PCR khuếch đại vùng trình tự 16S rDNA với chu kỳ nhiệt gồm giai đoạn tiền biến tính: Nhiệt độ 95°C trong 5 phút; giai đoạn biến tính: Nhiệt độ 95°C trong 30 giây; giai đoạn gắn mồi: Nhiệt độ 54°C trong 30 giây; giai đoạn kéo dài: Nhiệt độ 72°C trong 2 phút (30 chu kỳ); giai đoạn hoàn tất: Nhiệt độ 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR có một băng xuất hiện sáng và rõ nét trên gel agarose 2% với kích thước mong muốn khoảng 1.500 bp [3] sẽ được sử dụng để giải trình tự.

2.2.3. Phân lập TKT

Lấy 2,5 mL mẫu nước cho vào ống falcon chứa 7,5 mL môi trường TSB, tiến hành lắc 120

vòng/phút ở 37°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ, dịch tăng sinh được thêm vào 1% chloroform, lắc đều bằng máy vortex, ủ đá 30 phút. Ly tâm dung dịch 12.000 vòng/10 phút ở 4°C, rút phần dịch trong chuyển sang ống mới, thu được thực khuẩn thể thô. Trữ lạnh ở 4°C để chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo. Mỗi mẫu TKT thô được sàng lọc và tách rỗng trên phở ký chủ bao gồm nhiều dòng vi khuẩn *Vibrio* spp. TKT phân biệt dựa vào khả năng xâm nhiễm trên các dòng vi khuẩn ký chủ khác nhau.

2.2.4. Khảo sát khả năng xâm nhiễm của các dòng TKT vào vi khuẩn

Đánh giá khả năng xâm nhiễm của TKT bằng phương pháp thử nghiệm vết tan [9]: Chuẩn bị môi trường nền (TSB + 1,5% agar), môi trường bán rắn (TSB + 0,5% agar), vi khuẩn được nuôi lỏng trong môi trường TSB trong 24 giờ. Sau đó, hút 200 μ L huyền phù vi khuẩn hòa trộn trong môi trường bán rắn và đổ lên môi trường nền để yên 1 phút. Tiếp theo, nhỏ 2 μ L dịch TKT lên đĩa, đối chứng âm là môi trường TSB, ủ ở 37°C trong 24 giờ. So với mẫu đối chứng, tại vị trí nhỏ dung dịch TKT nếu xuất hiện vết tan (plaques) thì dung dịch có TKT ký sinh trên tế bào vi khuẩn.

Sàng lọc TKT bằng phương pháp khảo sát vết tan agar hai lớp. Sử dụng phương pháp khảo sát vết tan bằng agar hai lớp [9]. Chuẩn bị vi khuẩn được tăng sinh 24 giờ trong môi trường TSB ở nhiệt độ phòng. Chuẩn bị môi trường TSA (1,5% agar) và môi trường bán rắn TSA (0,5% agar) ủ ấm ở 56°C. Sử dụng micropipette rút 100 μ L từng dòng TKT ở độ pha loãng thích hợp hòa trộn với 100 μ L huyền phù vi khuẩn, ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng. Đồng nhất hỗn hợp TKT và vi khuẩn với 5 mL môi trường bán rắn. Hỗn hợp đã đồng nhất được đổ đều lên lớp môi trường nền, ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ, khảo sát hình thái và kích thước vết tan.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của TKT đến mật số, hình thái vi khuẩn

Khảo sát sự tác động của TKT lên mật số, hình thái vi khuẩn bằng phương pháp trải đếm theo mô tả của Trương Thị Bích Vân và cs (2022) [10] với một số thay đổi. Chuẩn bị đĩa môi trường XLD agar. Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn và nuôi lỏng trong môi trường TSB trong 24 giờ. Hỗn hợp gồm: 100 μ L huyền phù vi khuẩn được pha loãng đến nồng độ phù hợp và cho 100 μ L TKT trộn đều và để yên 30 phút, sau đó hút 200 μ L trải đều trên đĩa môi trường XLD agar (đối chứng là 100 μ L huyền phù vi khuẩn ở nồng độ $10^5 + 100 \mu$ L TSB). Ủ ở nhiệt độ phòng sau 24 giờ và tiến hành xác định số lượng (CFU/mL) và quan sát hình thái khuẩn lạc.

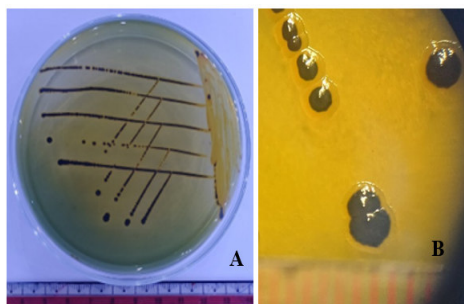
2.3. Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel 2016 để vẽ các biểu đồ thể hiện các kết quả thu được và chương trình ANOVA từ phần mềm Minitab 16.0 để phân tích so sánh các giá trị trung bình theo phép thử Fisher.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

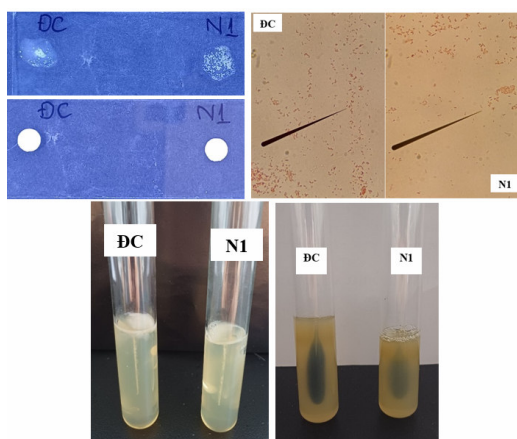
3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn

Kết quả phân lập được một dòng vi khuẩn N1 (*Citrobacter* spp.) trong nước ao tôm. Quan sát sự hình thành khuẩn lạc trên môi trường TCBS (Hình 1) cho thấy, khuẩn lạc có hình dạng tròn và đen, có kích thước 2 - 3 mm, bề mặt nhẵn bóng và mép khuẩn lạc phẳng. Sự xuất hiện khuẩn lạc có màu đen trên môi trường TCBS là do trong môi trường này vi khuẩn sinh khí H_2S tác dụng với ferric citrate ($C_6H_5FeO_7$) nên dạng khuẩn lạc có màu đen [11]. Bên cạnh đó, khí H_2S được tạo ra thông qua quá trình khử các axit amin chứa lưu huỳnh như cysteine và methionine, hoặc thông qua quá trình khử các hợp chất lưu huỳnh vô cơ như thiosulfate, sunfat, sulfite trong quá trình phân hủy protein, hoặc trong quá trình hô hấp kỵ khí chuyển đổi electron thành lưu huỳnh thay vì oxy [12]. Qua kết quả phân lập trên, chọn được dòng vi khuẩn có khuẩn lạc đen đã tách dòng để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Dòng vi khuẩn N1 (*Citrobacter* spp.) cấy rỗng trên môi trường TCBS (A); hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn N1 (*Citrobacter* spp.) dưới kính nhìn nổi (B)

3.2. Nhận diện vi khuẩn bằng các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa



Hình 2. Kết quả thử nghiệm catalase (A), oxidase (B), nhuộm Gram (C), tính di động (D), khả năng sinh khí H_2S (E) của mẫu vi khuẩn DC: *Salmonella senovar Enteritidis* ATCC 49223 và N1: *Citrobacter* spp.

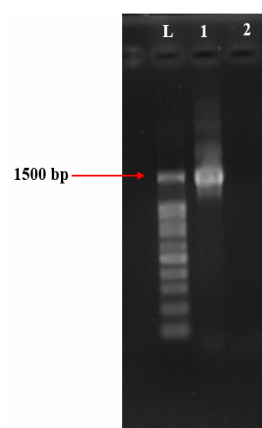
Kết quả thử nghiệm catalase cho thấy, mẫu vi khuẩn N1 (*Citrobacter* spp.) dương tính với catalase (xảy ra hiện tượng sủi bọt) (Hình 2A). Vì vậy, mẫu vi khuẩn đang khảo sát có sự hiện diện của enzyme catalase nên có khả năng phân hủy H_2O_2 thành H_2O và O_2 . Thử nghiệm oxidase cho thấy, vi khuẩn N1 (*Citrobacter* spp.) âm tính với oxidase do không đổi màu sắc trong 60 giây (Hình 2B). Có thể kết luận rằng, tế bào vi khuẩn không có sự hiện diện của enzyme cytochrome oxidase. Kết quả nhuộm Gram (Hình 2C) cho thấy, mẫu vi khuẩn N1 (*Citrobacter* spp.) có dạng hình que và thuộc vi khuẩn Gram âm vì vi khuẩn này bắt màu

hồng của thuốc nhuộm safranine. Hình 2D cho thấy, môi trường bị vẩn đục và khuẩn lạc phát triển lan ra khỏi đường cấy, chứng tỏ mẫu vi khuẩn N1 (*Citrobacter* spp.) có khả năng chuyển động; kết quả thử nghiệm trên môi trường SIM (Hình 2E) cho thấy, mẫu vi khuẩn N1 (*Citrobacter* spp.) có sinh khí H_2S . Bằng chứng là có kết tủa đen dọc theo đường cấy trong môi trường vì môi trường SIM chứa amoni sulfat màu và natri thiosulfat.

Tất cả các kết quả thử nghiệm sinh lý, sinh hóa trên của mẫu vi khuẩn N1 đều tương đồng với đặc điểm sinh lý, sinh hóa của mẫu vi khuẩn đối chứng (*Salmonella* ATCC 49223).

3.3. Kết quả điện di PCR với đoạn gen 16S rDNA và giải trình tự

Kết quả điện di mẫu PCR của đoạn gen 16S rDNA với cặp mồi 27F và 1492R cho thấy, mẫu vi khuẩn N1 có xuất hiện băng ở vị trí 1.500 bp (Hình 3), kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Alkhafaji và Hashim (2018) [3], đã phân lập được 3 mẫu thuộc *Citrobacter freundii* bằng cách khuếch đại đoạn gen 16S rDNA. So sánh trình tự vùng gen 16S rDNA của dòng vi khuẩn N1 với trình tự của các loài vi khuẩn trong ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST, kết quả cho thấy, trình tự vùng gen của dòng vi khuẩn N1 có độ tương đồng 99,59% với dòng vi khuẩn *Citrobacter freundii* (Hình 4). Từ các thử nghiệm sinh lý, sinh hóa và kết quả so sánh trình tự của mẫu N1 trên chương trình BLAST, có thể xác định rằng, mẫu vi khuẩn N1 là *Citrobacter freundii*.



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose (L: Ladder; 1: N1)

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
select all 100 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession	
☒ <i>Citrobacter freundii</i> strain C.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Citrobacter freundii</i>	1792	1792	97%	0.0	99.59%	1436	MN515093.1	
☒ <i>Citrobacter portucalensis</i> strain F1.N.103.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Citrobacter portucalensis</i>	1792	1792	97%	0.0	99.49%	1495	CHK21856.1	
☒ <i>Citrobacter freundii</i> strain ZY198 chromosome, complete genome	<i>Citrobacter freundii</i>	1790	14324	97%	0.0	99.49%	4967964	CP065247.1	
☒ <i>Citrobacter braakii</i> strain W3.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Citrobacter braakii</i>	1790	1790	97%	0.0	99.59%	1397	MTS34007.1	
☒ <i>Citrobacter</i> sp. strain NDSe-5.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Citrobacter</i> sp.	1790	1790	97%	0.0	99.59%	1407	MTS22812.1	

Hình 4. Kết quả BLAST trình tự 16S rRNA của mẫu vi khuẩn N1 trên NCBI

3.4. Kết quả phân lập thực khuẩn thể

Các dòng TKT được phân lập tại huyện An Minh, tỉnh Kiên Giang; huyện Duyên Hải, tỉnh Sóc Trăng và quận Cái Răng, thành phố Cần Thơ. Kết quả phân lập được 58 dòng TKT, trong đó có 40

mẫu nước ao tôm, 9 mẫu bùn đáy ao tôm, 1 mẫu nước ao sò huyết, 1 mẫu bùn ao sò huyết, 1 mẫu nước ao cua, 1 mẫu bùn ao cua, 2 mẫu tôm bệnh, 2 mẫu nước ao cá và 1 mẫu bùn ao cá được thể hiện qua bảng 1.

Bảng 1. Các dòng TKT được từ phân lập từ nước ao nuôi tôm, bùn đáy ao và tôm bệnh tại tỉnh Sóc Trăng, Kiên Giang và thành phố Cần Thơ

STT	TKT	STT	TKT	STT	TKT	STT	TKT	STT	TKT	STT	TKT
1	ΦNT1	11	ΦNT11	21	ΦNT21	31	ΦB1	41	ΦAM1	51	ΦDH3
2	ΦNT2	12	ΦNT12	22	ΦNT22	32	ΦB2	42	ΦAM2	52	ΦDH4
3	ΦNT3	13	ΦNT13	23	ΦNNT1	33	ΦB3	43	ΦAM3	53	ΦVHC1
4	ΦNT4	14	ΦNT14	24	ΦNNT2	34	ΦB4	44	ΦBM1	54	ΦVHC1
5	ΦNT5	15	ΦNT15	25	ΦNC1	35	ΦB5	45	ΦBM2	55	ΦBVH1
6	ΦNT6	16	ΦNT16	26	ΦNC2	36	ΦNS	46	ΦVH1	56	ΦBVH2
7	ΦNT7	17	ΦNT17	27	ΦNB	37	ΦBS	47	ΦVH2	57	ΦBVHC
8	ΦNT8	18	ΦNT18	28	ΦNNB	38	ΦNAC	48	ΦVH3	58	ΦTb
9	ΦNT9	19	ΦNT19	29	ΦNXP	39	ΦBAC	49	ΦDH1		
10	ΦNT10	20	ΦNT20	30	ΦNTB	40	ΦTB	50	ΦDH2		

Ghi chú: STT: số thứ tự, TKT: thực khuẩn thể.

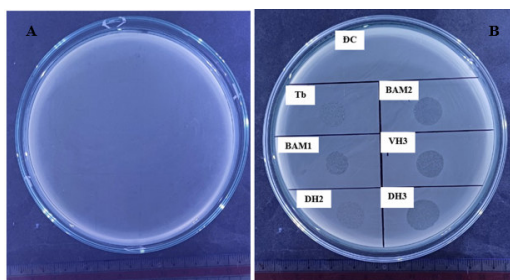
3.5. Khả năng xâm nhiễm của TKT bằng phương pháp thử nghiệm vết tan

Nghiên cứu về khả năng xâm nhiễm vi khuẩn *Citrobacter freundii* của TKT bằng phương pháp nhỏ giọt TKT được thể hiện. Sau khi khảo sát khả năng lây nhiễm của 58 dòng TKT trên vi khuẩn *Citrobacter freundii* nhận thấy, tại vị trí nhỏ giọt quan sát trong 24 giờ chỉ có 6 dòng TKT có xuất hiện các vết tan là các dòng: ΦTb, ΦBAM2, ΦBAM1, ΦVH3, ΦDH2, ΦDH3 trên nền vi khuẩn ký chủ thể hiện qua hình 5, còn lại 52 dòng TKT vết tan không rõ hoặc không có vết tan. Quan sát hình 5 cho thấy, có hai kiểu hình về hình thái vết tan được hiển thị là vết tan trong suốt và vết tan mờ đục với đường kính vết tan dao động trong khoảng 10 - 20 mm. Ở 4 dòng TKT: ΦBAM2, ΦBAM1, ΦVH3, ΦDH3 nhận thấy các vết tan trong và rõ trên

nền đục của vi khuẩn sau 24 giờ. Trong khi đó, 2 dòng TKT: ΦTb và ΦDH2 chỉ xuất hiện vết tan mờ.

Sự khác nhau giữa hai vết tan chính là sự tương tác vật lý và hóa học giữa TKT với vi khuẩn khi chúng tiếp xúc ban đầu. Các phản ứng này có thể gây ra các biến đổi trong môi trường xung quanh vi khuẩn, làm thay đổi sự phát triển của chúng và cuối cùng dẫn đến sự hình thành của các vết tan trong suốt hoặc mờ đục. Quá trình này phản ánh sự đa dạng và phức tạp của cơ chế tương tác giữa TKT và vi khuẩn [13]. Kiểu hình thái vết tan trong điển hình là dòng TKT đục, nơi mà vi khuẩn ký chủ sau khi bị TKT nhân lên sẽ chết và tạo ra một vết tan rõ ràng. Trong trường hợp này, vi khuẩn ký chủ không thể tiếp tục phát triển sau khi bị ảnh hưởng bởi TKT [14]. Ngược lại, kiểu hình thái của vết tan mờ hay đục thường được

quan sát ở các dòng TKT ôn hòa. Khi TKT này xâm nhập vào vi khuẩn ký chủ, chúng không giết chết vi khuẩn mà thay vào đó gắn phân tử ADN vào gen của vi khuẩn, tạo ra prophage. Vi khuẩn mang prophage được gọi là tế bào tiềm tan (lysogen) [15]. Sự khác nhau về hình thái vết tan tạo bởi các dòng TKT có thể là do sự khác nhau về cách thức xâm nhiễm cũng như về tốc độ sinh trưởng của TKT [16].

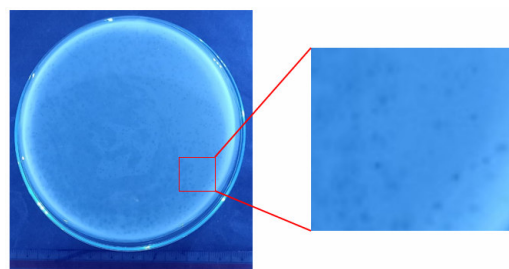


Hình 5. Kết quả thử nghiệm vết tan của 6 dòng TKT phân lập xâm nhiễm trên *Citrobacter freundii*. A: Vi khuẩn *Citrobacter freundii*; B: Vi khuẩn *Citrobacter freundii* + các dòng TKT

Vì vậy, qua kết quả khảo sát trên nhận thấy, dòng TKT ϕ DH3 cho vết tan trong và rõ nhất, chứng tỏ TKT này có khả năng ly giải hoàn toàn. Vì vậy, tiếp tục chọn TKT ϕ DH3 để tiến hành tách dòng và thí nghiệm khảo sát hoạt tính ly giải trên vi khuẩn *Citrobacter freundii*.

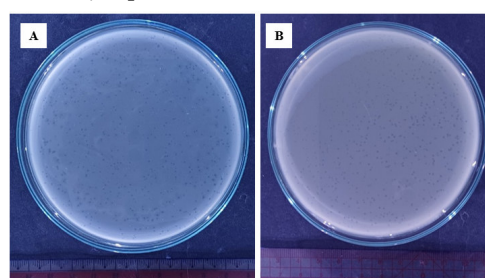
3.6. Sàng lọc TKT bằng phương pháp khảo sát vết tan agar hai lớp

Tiến hành sử dụng phương pháp agar hai lớp để đánh giá mức độ ảnh hưởng và hình thái vết tan của TKT ϕ DH3 đối với vi khuẩn *Citrobacter freundii*. Kết quả cho thấy, các vết tan phân bố đều trên toàn bộ đĩa thạch (Hình 6). Sau khi quan sát các vết tan trên bề mặt đĩa thạch nhận thấy, các vết tan khác nhau về hình dạng và kích thước nên sẽ cho ra nhiều hơn một loại TKT cho cùng một vi khuẩn ký chủ. Hình 6 cho thấy, có hai hình dạng vết tan trên đĩa thạch được hiển thị là vết tan hình tròn, trong suốt và vết tan có tâm trong, có vòng sáng bên ngoài. Từ đó, có thể tách dòng và phân lập được 2 dòng TKT khác nhau cho cùng một vi khuẩn ký chủ.



Hình 6. Kết quả khảo sát vết tan của TKT ϕ DH3

Sau nhiều lần sàng lọc đã tách dòng thành công hai TKT có kích thước và hình dạng đồng nhất thể hiện qua hình 7A và 7B.

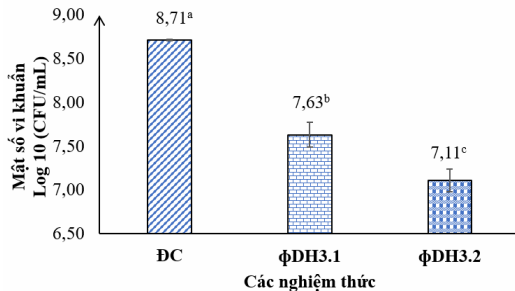


Hình 7. Hình thái vết tan ϕ DH3.1 (A) và ϕ DH3.2 (B) trên nền vi khuẩn *Citrobacter freundii*

Hai hình thái vết tan của TKT ϕ DH3 được thể hiện qua hình 7. Quan sát hình 7A cho thấy, sự hiện diện các vết tan trong, rõ, có vòng sáng bên ngoài, tức là các vùng bán trong suốt xung quanh vết tan; hình 7B cho thấy, các vết tan hình tròn và trong suốt trên nền vi khuẩn *Citrobacter freundii*, điển hình cho các TKT sinh tan [17]. Quá trình ly giải vi khuẩn của TKT bằng phương pháp agar hai lớp cho thấy, TKT hoạt động theo cơ chế làm giảm hoặc loại bỏ màng tế bào của vi khuẩn. TKT bám vào điểm thụ cảm của tế bào vi khuẩn bằng bề mặt ở cuối, sau đó tiêm vật liệu di truyền của nó vào và sử dụng bộ máy trao đổi chất của vật chủ để nhân lên, dẫn đến sự phân giải tế bào và giải phóng các TKT mới bên trong màng tế bào. Các TKT có đầu lớn hơn sẽ có xu hướng hình thành các vết tan nhỏ hơn, ngược lại, TKT có đầu nhỏ các vết tan hình thành sẽ lớn hơn. Điều này có thể là do thực tế các virion lớn hơn (có đầu lớn hơn) sẽ khuếch tán chậm hơn qua lớp thạch trên cùng so với các virion nhỏ hơn, do đó tạo ra các vết tan nhỏ hơn [14].

3.7. Ảnh hưởng TKT đến mật số vi khuẩn

Kết quả khảo sát khả năng tương tác của hai dòng TKT ϕ DH3.1 và ϕ DH3.2 với vi khuẩn *Citrobacter freundii* bằng phương pháp trải đếm cho thấy, mật số vi khuẩn có sự thay đổi (Hình 8).



Hình 8. Ảnh hưởng của TKT lên mật số vi khuẩn *Citrobacter freundii*

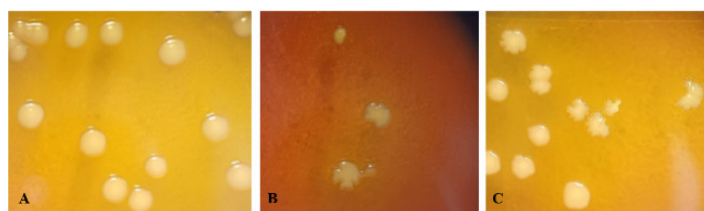
Ghi chú: ĐC: Vi khuẩn *Citrobacter freundii*; ϕ DH3.1: Vi khuẩn *Citrobacter freundii* + ϕ DH3.1; ϕ DH3.2: Vi khuẩn *Citrobacter freundii* + ϕ DH3.2.

Sự thay đổi mật số vi khuẩn khi bổ sung TKT ϕ DH3.1 và ϕ DH3.2 khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng không bổ sung TKT ($p < 0,05$). Ở nghiệm thức đối chứng, chỉ có vi khuẩn được nuôi trong môi trường TSB có mật số khuẩn lạc là 8,71 log₁₀ CFU/mL, ở hai nghiệm thức chủng TKT ϕ DH3.1 và ϕ DH3.2 có mật số khuẩn lạc lần lượt là 7,63 log₁₀ CFU/mL và 7,11 log₁₀ CFU/mL cho thấy có sự giảm rõ rệt so với nghiệm thức đối chứng. Kết quả trên cho thấy, TKT ϕ DH3.2 (giảm 1,6 log₁₀ CFU/mL) làm giảm mật số vi khuẩn cao hơn TKT

ϕ DH3.1 (giảm 1,08 log₁₀ CFU/mL). Điều này có thể được giải thích, do khi chủng TKT vào vi khuẩn, TKT sinh trưởng, phát triển mạnh dần ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Citrobacter freundii*, làm vi khuẩn giảm sức sống và chết đi nên số lượng khuẩn lạc hình thành ít hơn so với nghiệm thức đối chứng [18].

3.8. Ảnh hưởng TKT đến hình thái vi khuẩn

Sự thay đổi hình thái vi khuẩn khi tương tác với hai dòng TKT ϕ DH3.1 và ϕ DH3.2 được thể hiện qua hình 9. Quan sát khuẩn lạc bằng kính soi nổi cho thấy, hình thái khuẩn lạc *Citrobacter freundii* trên môi trường XLD có màu trắng đục, hình tròn, bề mặt nhẵn, bóng có rìa màu trắng và kích thước khuẩn lạc khoảng 2 mm (Hình 9A), kết quả mô tả tương tự với kết quả nghiên cứu của Awad và Al-saadi (2022) [19]. Sau khi bổ sung 100 μ L TKT ϕ DH3.1 và ϕ DH3.2 vào huyền phù vi khuẩn *Citrobacter freundii* đã làm thay đổi hình dạng khuẩn lạc một cách rõ rệt, điều này quan sát thấy ở hình 9B và 9C. Ở nghiệm thức chủng TKT ϕ DH3.1 và ϕ DH3.2, không cho thấy sự khác biệt về màu sắc và kích thước khuẩn lạc, nhưng có thể nhận thấy ở cả hai nghiệm thức khi kết hợp TKT đều làm thay đổi hình dạng khuẩn lạc từ dạng nguyên, tròn thành khuẩn lạc có hình thái răng cưa, các rìa không đồng đều.



Hình 9. Ảnh hưởng TKT lên hình thái vi khuẩn *Citrobacter freundii*

Ghi chú: A: Vi khuẩn *Citrobacter freundii*; B: Vi khuẩn *Citrobacter freundii* + ϕ DH3.1; C: Vi khuẩn *Citrobacter freundii* + ϕ DH3.2

Điều này có thể giải thích là do sự phân giải của TKT tiết ra enzyme lytic xâm nhiễm vào vi khuẩn ký chủ. Bằng cách phá vỡ cấu trúc peptidoglycan của thành tế bào vi khuẩn, enzyme lytic không chỉ làm cho vi khuẩn giảm đi mà còn làm thay đổi bề mặt và hình dạng ban đầu của vi khuẩn [20]. Điều này không chỉ ảnh hưởng đến

khả năng ức chế vi khuẩn mà còn mở ra những triển vọng mới trong việc phát triển các phương pháp điều trị sinh học để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh.

4. KẾT LUẬN

Phân lập được 1 dòng vi khuẩn *Citrobacter freundii* qua các thử nghiệm sinh lý, sinh hóa và

kết quả giải trình tự. Tuyến chọn được hai dòng TKT DH3.1 và DH3.2 có khả năng xâm nhiễm và hình thành vết tan hoàn toàn với chủng vi khuẩn *Citrobacter freundii*. Sau khi chủng hai TKT DH3.1 và DH3.2 vào vi khuẩn ký chủ *Citrobacter freundii* (N1) đã làm thay đổi mật số và hình thái khuẩn lạc vi khuẩn này. Kết quả của nghiên cứu cho thấy tiềm năng của thực khuẩn thể trong việc ức chế vi khuẩn *Citrobacter freundii* gây bệnh động vật thủy sản và trên người.

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

1. Madurantakam Royam, M. & Nachimuthu, R. (2020). Isolation, characterization, and efficacy of bacteriophages isolated against *Citrobacter* spp. An *in vivo* approach in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Research in Microbiology*, 171(8), 341 - 350.
2. Cortés-Sánchez, A. D. J., Salgado-Cruz, M. de la P., Diaz-Ramírez, M., Torres-Ochoa, E. & Espinosa-Chaurand, L. D. (2023). A Review on Food Safety: The Case of *Citrobacter* sp., Fish and Fish Products. *Applied Sciences*, 13(12), Article 12.
3. Alkhafaji, M. & Hashim, M. (2018). Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from chicken meat samples using cultural and molecular techniques. *Iraqi Journal of Science*, 59, 1216 - 1224.
4. Tian, F., Li, J., Nazir, A. & Tong, Y. (2021). Bacteriophage – A Promising Alternative Measure for Bacterial Biofilm Control. *Infection and Drug Resistance*, 14, 205 – 217.
5. Hồng Mộng Huyền, Võ Tấn Huy và Trần Thị Tuyết Hoa (2018). Hoạt tính kháng khuẩn của một số cao chiết thảo dược kháng vi khuẩn gây bệnh ở tôm nuôi. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 54, 143 - 150.
6. Oliveira, H., Pinto, G., Oliveira, A., Oliveira, C., Faustino, M. A., Briers, Y., Domingues, L. & Azeredo, J. (2016). Characterization and genome sequencing of a *Citrobacter freundii* phage CfP1 harboring a lysin active against multidrug-resistant isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24), 10543 - 10553.
7. Truong Thi Bich Van, Tran Vo Minh Thu (2023). Isolation of toxic gas-producing bacteria (*Desulfovibrio* spp.) from shrimp ponds and potential of bacteriophages as biocontrol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(6), 59 - 65.
8. Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116 - 117.
9. Orozco-Ochoa, A. K., González-Gómez, J. P., Castro-del Campo, N., Lira-Morales, J. D., Martínez-Rodríguez, C. I., Gomez-Gil, B. & Chaidez, C. (2022). Characterization and genome analysis of six novel *Vibrio parahaemolyticus* phages associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Virus Research*, 323, 198973.
10. Trương Thị Bích Vân, Võ Ngọc Trâm An, Nguyễn Thị Phương Uyên, Lê Văn Trọng, Đoàn Thị Thơm, Võ Thành Duy, Lưu Đoàn Minh Nhật, Võ Thị Thiên Trúc, Nguyễn Hữu Trí và Tiêu Ngọc Thanh (2022). Sự ảnh hưởng của thực khuẩn thể và các loại cao chiết đối với *Vibrio* spp. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 58, 232 – 238.
11. Wu, H., Meng, Q. & Yu, Z. (2016). Evaluation of ferric oxide and ferric citrate for their effects on fermentation, production of sulfide and methane and abundance of select microbial populations using *in vitro* rumen cultures. *Bioresource Technology*, 211, 603 – 609.
12. Van, T. T. B. & Thu, T. V. M. (2023). Isolation of toxic gas-producing bacteria (*Desulfovibrio* spp.) from shrimp ponds and potential of bacteriophages as biocontrol. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 11(Issue), 59 – 65.
13. Glonti, T. & Pirnay, J.-P. (2022). In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses*, 14(7), 1490.
14. Jurczak-Kurek, A., Gasior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Necel, A., Jakubowska-Deredas, M., Narajczyk, M., Richert, M., Mieszkowska, A., Wróbel, B., Węgrzyn, G. & Węgrzyn, A. (2016). Biodiversity of

bacteriophages: Morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports*, 6, 34338.

15. Biền Văn Minh (2012). *Vì sinh vật học*. Nxb Đại học Huế.

16. Tống Thị Ánh Ngọc, Trần Thị Mộng Cầm, Phạm Kim Duyên, Trần Trâm Anh, Nguyễn Cẩm Tú và Nguyễn Thị Thu Nga (2022). 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. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 228, 201 - 210.

17. Sharma, M. (2013). Lytic bacteriophages. *Bacteriophage*, 3(2), e25518.

18. Naureen, Z., Dautaj, A., Anpilogov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., Maltese, P. E.,

Cristofoli, F., De Antoni, L., Beccari, T., Dundar, M. & Bertelli, M. (2020). Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 91(Suppl 13), e2020024.

19. Awad, N. & Al-saadi, M. (2022). Isolation and molecular diagnosis of *Citrobacter freundii* in raw meat (beef, mutton and fish) in AL-Rusafa district of Baghdad city. *Biochemical And Cellular Archives*, 21(1), 1482 - 1491.

20. Sagar, S. S., Rani, S. & Pushpa Sadanandan, S. (2023). Combined Effect of Isolated Bacteriophage and Neem Extract on Isolated Multiple Drug-Resistant Pathogenic *Escherichia coli* E1 From Well Water. *Environmental Health Insights*, 17, 1 - 9.

INVESTIGATING THE EFFECTS OF BACTERIOPHAGES AGAINST *Citrobacter* spp. BACTERIA ISOLATED FROM WATER IN SHRIMP PONDS

**Truong Thi Bich Van¹, Le Thi Cam Tu¹, Ha Thi Bao Tran¹,
Le Anh Gia Huy¹, Nguyen Pham Anh Thi¹**

¹*Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*

Summary

Citrobacter spp. is an opportunistic pathogen that causes diseases in aquaculture and is a multidrug-resistant bacterial strain of current concern. To effectively and safely address this issue, finding alternatives to antibiotics is becoming more urgent than ever. Currently, using bacteriophages is a potential biological method to replace antibiotics in treating diseases caused by bacteria. Therefore, the study "*Investigating the effects of bacteriophages against Citrobacter spp. bacteria isolated from water in shrimp ponds*" was conducted with aim of indentifying at least one phage strain capable of infecting *Citrobacter* spp. isolated from shrimp pond bottom water and mud. This project aims to identify phage strains capable of inhibiting *Citrobacter* spp. bacteria. The result was the isolation of a bacteria strain from shrimp pond water and the identification of bacterial sample N1 as *Citrobacter freundii*. From samples of sick shrimp, shrimp pond water and mud, 58 bacteriophage strains were isolated. Using the drop-plaque method, six phage strains, φTb, φBAM2, φBAM1, φVH3, φDH2 and φDH3, were selected for their ability to infect *Citrobacter* spp. Among them, the DH3 bacteriophage strain showed the clearest and most transparent plaque on the *Citrobacter freundii* bacterial background. The DH3 bacteriophage was chosen to evaluate its impact to bacterial population and morphology of *Citrobacter freundii* colonies using the spread counting method. The evaluation results indicated that the phage strain φDH3 reduced the bacterial population and altered the morphology of *Citrobacter freundii*.

Keywords: *Citrobacter* spp., bacteriophage, the double - layer agar (DLA), plaque.

Ngày nhận bài: 19/4/2024

Ngày chuyển phản biện: 7/5/2024

Ngày thông qua phản biện: 24/5/2024

Ngày duyệt đăng: 31/5/2024