

PHÂN LẬP VI KHUẨN, THỰC KHUẨN THỂ TỪ AO TÔM VÀ KHẢO SÁT SỰ TÁC ĐỘNG CỦA THỰC KHUẨN THỂ KẾT HỢP ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Citrobacter meridianamericanus*

Trương Thị Bích Vân¹, Hà Thị Bảo Trân¹, 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

Vi khuẩn CM1 phân lập từ bùn đáy ao tôm và kết quả định danh là *Citrobacter meridianamericanus*. Khảo sát phổ ký chủ của 8 dòng thực khuẩn thể (bacteriophage-phage- ϕ -TKT) phân lập từ bùn đáy ao tôm và 8 dòng TKT kết hợp đối với vi khuẩn ký chủ là các dòng vi khuẩn: *Salmonella enteritidis* ATCC 49223, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 và *E. coli* ATCC 25922, *Citrobacter meridianamericanus*. Kết quả, TKT ϕ BT3 cho vết tan trong trên ký chủ *E. coli* ATCC 25922. Sáu dòng TKT gồm: ϕ BT1, ϕ BT6, ϕ BT7, ϕ BT8, ϕ BT9 và thực khuẩn thể kết hợp ϕ BT7 + ϕ BT9 cho vết tan trong rõ ràng trên ký chủ *Citrobacter* spp.. Dựa trên kết quả đó, 5 dòng TKT: ϕ BT1, ϕ BT5, ϕ BT6, ϕ BT7 và ϕ BT9 được chọn để đánh giá sự ảnh hưởng của TKT lên mật số khuẩn lạc của vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* bằng phương pháp trải đếm. Kết quả đánh giá cho thấy, 5 dòng thực khuẩn thể đều làm giảm mật số vi khuẩn có ý nghĩa thống kê và có những tác động đặc trưng lên hình thái khuẩn lạc. Trong đó, TKT ϕ BT9 làm giảm mật số khuẩn lạc nhiều nhất, giảm đến 1,45 log CFU/mL và TKT ϕ BT8 có mật độ vi khuẩn giảm thấp nhất, 1,16 log CFU/mL. Kết quả cho thấy, dòng TKT ϕ BT9 có hiệu quả kiểm soát vi khuẩn tốt nhất. Bên cạnh đó, sự kết hợp của 2 dòng TKT làm tăng khả năng ức chế vi khuẩn và hạn chế khả năng đối kháng của vi khuẩn đối với TKT.

Từ Khóa: *Citrobacter meridianamericanus*, thực khuẩn thể, thực khuẩn thể kết hợp, phổ ký chủ, vết tan.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do vi khuẩn là mối quan tâm lớn trong ngành nuôi trồng thủy sản vì chúng gây thiệt hại kinh tế đáng kể do tôm chết hàng loạt. Trong những năm qua, loài *Citrobacter* spp. là nguyên nhân gây nhiễm trùng ở cá và các đối tượng nuôi trồng thủy sản khác. *Citrobacter* spp. là một loại vi khuẩn kỵ khí Gram âm, hiếu khí, thuộc họ Enterobacteriaceae. Vi khuẩn này thường phổ biến trong tự nhiên và là mầm bệnh chung gây ra bệnh đồng mắc giữa người và cá [1]. Một số vi khuẩn *Citrobacter* spp., đặc biệt là *C. koseri*, *C. freundii*, *C. braakii* thường được phát hiện ở các bệnh lý ở trẻ sơ sinh, nhiễm trùng đường tiết niệu [2].

Trong những năm gần đây, thuốc kháng sinh được sử dụng rộng rãi cho vật nuôi [3], trong số các dòng vi khuẩn kháng kháng sinh có *Citrobacter* spp., đặc biệt các biến thể có khả năng

kháng kháng sinh rất cao [4]. Để hạn chế tình trạng kháng kháng sinh ngày càng nhiều thì việc tìm một giải pháp thay thế là rất cần thiết. Thực khuẩn thể (TKT – bacteriophage) là virus ký sinh và ức chế vi khuẩn. Liệu pháp TKT (phage therapy) đang được xem là tác nhân sinh học có khả năng kiểm soát vi khuẩn trong tự nhiên. Tuy nhiên, TKT thường có tính đặc hiệu với một dòng vi khuẩn nhất định, vì thế phương pháp kết hợp nhiều loại TKT (phage cocktail) được sử dụng nhằm mở rộng phạm vi ký chủ hoặc gia tăng khả năng ức chế sự phát triển của các vi khuẩn có tính kháng [5]. Từ những lý do trên, nghiên cứu “Phân lập vi khuẩn và thực khuẩn thể từ ao tôm và khảo sát sự tác động của thực khuẩn thể kết hợp đối với vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus*” được thực hiện nhằm khảo sát và đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn của từng dòng TKT riêng lẻ cũng

như khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh trên tôm bằng việc kết hợp nhiều loại TKT.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Các dòng vi khuẩn và TKT được phân lập từ các nguồn nước, bùn đáy ao tôm, cá tại các tỉnh: Cà Mau, Kiên Giang, Sóc Trăng.

Các dòng vi khuẩn *Salmonella* ATCC 49223, *Salmonella* ATCC 14028 và *E. coli* ATCC 25922 được cung cấp tại Phòng thí nghiệm Virus học tiên tiến, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

Môi trường sử dụng trong thí nghiệm: TSB (Tryptic Soy Broth - Ấn Độ), EMB (Eosin Methylene Blue - Ấn Độ), SIM (Sulfide Indole Motility), TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar - Ấn Độ) và TSA (Tryptone Soya Agar - Ấn Độ).

2.2. Phương pháp phân lập

2.2.1. Phân lập và định danh vi khuẩn *Citrobacter* spp.

Tiến hành lấy 2,5 mL mẫu thu được và 7,5 mL môi trường TSB vào ống falcon. Rút 100 μ L mẫu nước trải lên đĩa môi trường TCBS, đem ủ đĩa 24 giờ ở nhiệt độ phòng, nhận diện đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tách riêng khuẩn lạc.

2.2.1.1. Nhận diện vi khuẩn bằng các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa

- Mô tả đặc điểm khuẩn lạc trên đĩa thạch:

Mô tả đặc điểm khuẩn lạc dựa trên nghiên cứu mô tả hình thái khuẩn lạc vi khuẩn của theo mô tả của Van và Thu (2023) [6]. Hình dạng: Tròn, không đều, dạng rẽ. Bề mặt khuẩn lạc: Nhẵn bóng hay xù xì. Bìa khuẩn lạc: Đều, gợn sóng, phân thùy, uốn cong. Độ nổi: Dẹt, nhô lên, vòng, hình vòm, vòm trung. Màu sắc theo khuẩn lạc trên đĩa.

- Phương pháp nhuộm Gram:

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Van và Thu (2023) [6].

- Thử nghiệm khả năng chuyển động của vi khuẩn:

Dùng que cấy lấy một ít khuẩn lạc từ môi trường TSA sau 24 giờ nuôi cấy. Sau đó, đâm một lần đến độ sâu chỉ từ 1/3 - 1/2 vào giữa ống. Đảm bảo giữ que cấy ở cùng một đường thẳng trong môi trường. Ủ ở 35 - 37°C và kiểm tra hàng ngày (tối đa 7 ngày).

Quan sát vùng phát triển khuếch tán lan ra khỏi đường cấy.

- Thử nghiệm catalase:

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Li và cs (2020) [7].

- Thử nghiệm oxidase:

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Aryal (2023) [8].

- Thử nghiệm sinh khí H_2S :

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Kyule và cs (2022) [9].

2.2.1.2. Nhận diện vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử và định danh vi khuẩn *Citrobacter* spp.

- Phương pháp ly trích ADN vi khuẩn:

Cho 2 mL dịch huyền phù vi khuẩn đã tăng sinh trong 24 giờ vào eppendorf 2 mL. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Giữ phần sinh khối bỏ dịch trong. Cho 800 μ L Lysis buffer vào eppendorf và trộn đều, sau đó để yên 15 phút. Cho 800 μ L chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) lắc đều, để yên 10 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Rút 500 μ L dịch nổi qua eppendorf 1,5 mL mới, thêm 500 μ L ethanol 96°, lắc đều. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ dịch trong và giữ phần lắng. Cho thêm 500 μ L ethanol 70%, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ dịch trong giữ phần lắng. Sấy ADN ở 35 - 45°C trong 10 phút. Hoà tan ADN bằng 150 μ L TE 0,1 X.

- Định danh vi khuẩn *Citrobacter* spp. bằng kỹ thuật PCR:

Theo Kyule và cs (2022) [9], cặp mồi được sử dụng để khuếch đại đoạn trình tự 16S rRNA:

Mỗi xuôi: 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Mỗi ngược: 1492R:

GCATCTGAGTGTCTAGTATCTGTCC

Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA gồm ba giai đoạn được thực hiện 30 chu kỳ có chu trình nhiệt như sau: 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. Ba giai đoạn này được thực hiện với 35 chu kỳ. Giai đoạn hoàn tất: Nhiệt độ 72°C trong 10 phút. Giai đoạn trữ mẫu: Nhiệt độ 4°C.

2.2.2. Phân lập thực khuẩn thể

Mẫu sau khi đem về phòng thí nghiệm tiến hành lấy 2,5 mL mẫu và 7,5 mL môi trường TSB vào ống falcon để qua đêm trên máy lắc 120 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Huyền phù vi khuẩn được hoà trộn với 1% thể tích chloroform, giữ lạnh 30 phút, ly tâm dung dịch với vận tốc 12.000 vòng trong 10 phút, thu phần dịch trong và bỏ phần kết tủa (phần dịch trong được gọi là TKT thể thô).

Các TKT được kết hợp theo tỉ lệ 1: 1 để thực hiện đánh giá khả năng xâm nhiễm của TKT đối với vi khuẩn.

2.3. Đánh giá khả năng xâm nhiễm của các dòng TKT vào vi khuẩn *Citrobacter* spp.

2.3.1. Đánh giá khả năng xâm nhiễm của TKT bằng phương pháp thử nghiệm vết tan

Thí nghiệm sử dụng phương pháp agar hai lớp của Kropinski và cs (2009) [10] đã được thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm như sau: Huyền phù vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* tăng sinh 24 giờ trong môi trường TSB ở nhiệt độ phòng. Chuẩn bị môi trường nền (TSA 1,5% agar), môi trường bán rắn (TSA 0,5% agar), các dòng TKT. Hút 200 μ L vi khuẩn và trộn đều với 4 mL môi trường bán rắn (ở 56°C) sau đó đổ lên đĩa môi trường nền. Rút 3 μ L TKT nhỏ lên các vị trí đã đánh dấu trên đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, quan sát vết tan (nếu có).

2.3.2. Khảo sát phổ ký chủ của TKT

Phương pháp thực hiện: Thí nghiệm được bố trí gần tương đồng với thí nghiệm khảo sát vết tan bằng agar hai lớp [10]. Huyền phù vi khuẩn được nuôi 24 giờ trong môi trường TSB ở điều kiện ủ lắc. Chuẩn bị môi trường nền (TSA 1,5% agar), môi trường bán rắn (TSA 0,5% agar), các dòng TKT thể. Hút 200 μ L vi khuẩn và trộn đều với 4 mL môi trường bán rắn (ở 56°C) sau đó đổ lên đĩa môi trường nền. Rút 3 μ L TKT nhỏ lên các vị trí đã đánh dấu trên đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, quan sát vết tan (nếu có).

2.3.3. Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn của TKT bằng phương pháp trải đếm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại và sử dụng phương pháp trải đếm

theo mô tả của Van và Thu (2023) [6] như sau: Huyền phù vi khuẩn *Citrobacter* spp. tăng sinh 24 giờ trong môi trường TSB ở nhiệt độ phòng và được pha loãng nối tiếp đến 10^{-6} . Chuẩn bị đĩa Petri có môi trường EMB. Sử dụng micropipette rút 100 μ L từng dòng TKT hoà trộn với 100 μ L huyền phù vi khuẩn đã pha loãng, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Đối với TKT kết hợp sử dụng tỷ lệ 1: 1 đảm bảo thể tích tương đương với các thí nghiệm TKT đơn lẻ. Hỗn hợp đã đồng nhất được đổ đều lên lớp môi trường nền, dùng que trải, trải đều cho đến khi bề mặt môi trường khô lại, ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ quan sát ghi nhận số lượng khuẩn lạc hình thành trên các đĩa chứa TKT so với đĩa đối chứng.

Số lượng khuẩn lạc hình thành trên các đĩa chứa TKT so với đĩa đối chứng (CFU/mL). Công thức tính CFU/mL:

$$A \text{ (CFU/mL)} = \frac{N}{n \cdot V \cdot f}$$

Trong đó: A là số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1 mL mẫu; N là tổng số khuẩn lạc đếm được; n là số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ; V là thể tích dịch mẫu (mL) cấy vào trong mỗi đĩa; f là độ pha loãng tương ứng.

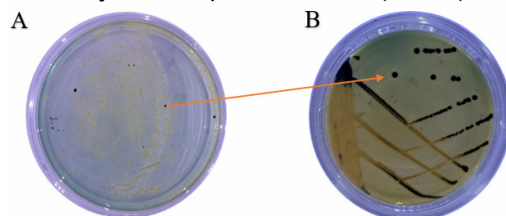
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Các kết quả thí nghiệm được phân tích ANOVA và so sánh các giá trị trung bình theo phép thử Fisher bằng phần mềm Minitab 16.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Citrobacter* spp.

Kết quả phân lập trên môi trường TCBS được một dòng vi khuẩn hiển thị khuẩn lạc đen từ nguồn mẫu bùn đáy ao tôm tại tỉnh Cà Mau (Hình 1).

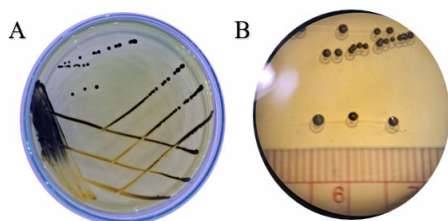


Hình 1. Kết quả phân lập dòng vi khuẩn CM1 (*Citrobacter* spp.)

Ghi chú: A: Hình trái phân lập vi khuẩn trên môi trường TCBS; B: Hình cấy vi khuẩn CM1 (*Citrobacter spp.*) trên môi trường TCBS.

3.1.1. Mô tả đặc điểm khuẩn lạc trên đĩa thạch

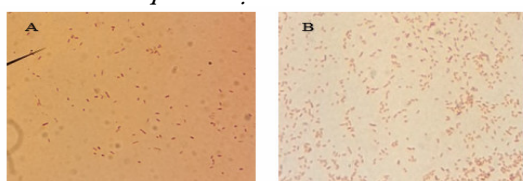
Tiếp tục cấy dòng vi khuẩn CM1 trên môi trường TCBS để quan sát đặc điểm khuẩn lạc. Dòng vi khuẩn phân lập có khả năng sinh khí H_2S , có tốc độ phát triển về sinh khối nhanh và kích thước khuẩn lạc có thể quan sát sau 1 – 2 ngày nuôi cấy. Mô tả khuẩn lạc (Hình 2) của dòng vi khuẩn phân lập CM1 nhận thấy đặc điểm như sau: Khuẩn lạc có hình dạng tròn, có độ lồi, mặt trơn láng, rìa dạng đều và khuẩn lạc có màu đen, kích thước mỗi khuẩn lạc khoảng 2 - 3 mm.



Hình 2. Hình dạng khuẩn lạc của vi khuẩn CM1 trên môi trường TCBS

Ghi chú: A: Hình cấy rỗng vi khuẩn *Citrobacter spp.* trên môi trường TCBS; B: Hình khuẩn lạc vi khuẩn *Citrobacter spp.* chụp dưới kính nhìn nổi.

3.1.2. Kết quả nhuộm Gram



Hình 3. Kết quả nhuộm Gram của mẫu vi khuẩn CM1

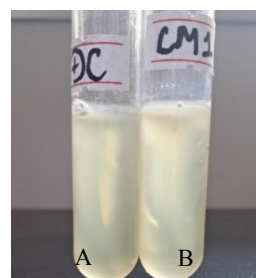
Ghi chú: A: ĐC (Đối chứng): *Salmonella enteritidis* ATCC 49223; B: CM1: Vi khuẩn *Citrobacter spp.*

Kết quả nhuộm Gram (Hình 3) cho thấy, mẫu vi khuẩn CM1 thuộc vi khuẩn Gram âm giống với mẫu vi khuẩn đối chứng (Hình 3.A). CM1 là vi khuẩn Gram âm vì bắt màu hồng của thuốc nhuộm safranin.

3.1.3. Kết quả thử nghiệm khả năng chuyển động của vi khuẩn

Sau 2 - 3 ngày nuôi cấy quan sát thấy mẫu vi khuẩn CM1 trên môi trường có hiện tượng bị đục

và khuẩn lạc phát triển lan ra khỏi vết cấy, giống với mẫu vi khuẩn đối chứng (Hình 4).

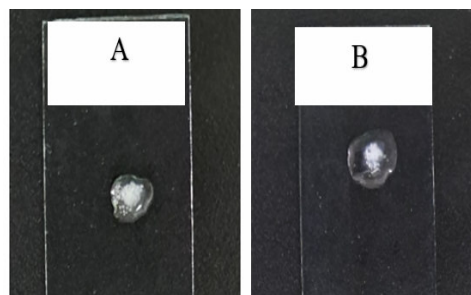


Hình 4. Kết quả thử nghiệm khả năng chuyển động của vi khuẩn CM1

Ghi chú: A: ĐC (Đối chứng *Salmonella enteritidis* ATCC 49223; B: vi khuẩn CM1 (*Citrobacter spp.*).

3.1.4. Kết quả thử nghiệm catalase, oxidase

Từ kết quả thử nghiệm catalase (Hình 5) có thể thấy, mẫu vi khuẩn CM1 (Hình 5.B) dương tính với catalase (xảy ra hiện tượng sủi bọt), tương tự mẫu vi khuẩn đối chứng (Hình 5.A). Catalase là một enzyme được sản xuất bởi các vi sinh vật sống trong môi trường có oxy để vô hiệu hóa tác dụng diệt khuẩn của các dạng chất chuyển hóa oxy độc hại như hydro peroxide (H_2O_2). 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 .

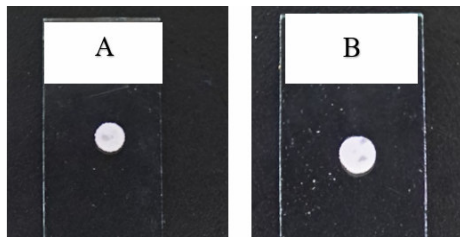


Hình 5. Kết quả thử nghiệm catalase

Ghi chú: A: ĐC (Đối chứng *Salmonella enteritidis* ATCC 49223; B: vi khuẩn CM1 (*Citrobacter spp.*).

3.1.5. Kết quả thử nghiệm oxidase

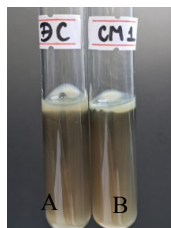
Kết quả thử nghiệm oxidase (Hình 6.B) cho thấy, vi khuẩn CM1 âm tính với oxidase do không làm thay đổi màu sắc giấy thử trong 60 giây, kết quả tương đồng với mẫu vi khuẩn đối chứng (Hình 6.A). Từ kết quả trên cho thấy, vi khuẩn CM1 không có enzyme cytochrome.



Hình 6. Kết quả thử nghiệm oxidase

Ghi chú: A: ĐC (Đối chứng): *Salmonella enteritidis* ATCC 49223; B: vi khuẩn CM1 (*Citrobacter* spp.)

3.1.6. Kết quả thử nghiệm khả năng sinh khí H_2S



Hình 7. Kết quả thử nghiệm khả năng sinh khí H_2S

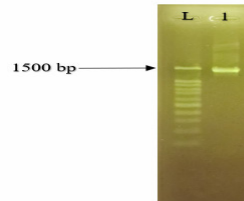
Ghi chú: A: ĐC (Đối chứng): *Salmonella enteritidis* ATCC 49223; B: Vi khuẩn CM1 (*Citrobacter* spp.).

Kết quả thử nghiệm trên môi trường SIM được thể hiện qua hình 7 cho thấy, mẫu vi khuẩn *Citrobacter* spp. có sinh khí H_2S , kết quả giống với mẫu vi khuẩn đối chứng. Bằng chứng là có kết tủa đen dọc theo đường cấy trong môi trường vì môi trường SIM chứa amoni sulfate màu và natri thiosulfat.

3.1.7. Nhận diện vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử và định danh vi khuẩn *Citrobacter* spp.

- Kết quả PCR đoạn trình tự 16S rRNA:

Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 2% để kiểm tra. Kết quả điện di mẫu PCR của đoạn gen 16S rRNA (Hình 8.) cho thấy, mẫu CM1 có sự xuất hiện của vạch ở vị trí khoảng 1.500 bp.



Hình 8. Kết quả PCR đoạn trình tự 16S rRNA

Ghi chú: Giếng L: Thang đo kích thước 1.500 bp; giếng 1: Mẫu vi khuẩn CM1.

- Kết quả giải trình tự của vi khuẩn CM1:

Kết quả so sánh trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn CM1 với trình tự gen trong ngân hàng gen trên NCBI bằng công cụ BLAST cho thấy, trình tự vùng gen của dòng vi khuẩn CM1 có độ tương đồng là 100% với dòng vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* (Hình 9).

3.2. Kết quả phân lập TKT

Đã phân lập được 60 dòng TKT từ 12 mẫu bùn, nước ao nuôi tôm, nước ao nuôi cá tại các tỉnh Kiên Giang, Cà Mau, Sóc Trăng. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Citrobacter sp. BR102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Citrobacter mer...	1635	1635	99%	0.0	100.00%	1542	ON890426.1
✓	Citrobacter portucalensis strain 2017-45-163 chromosome, complete genome	Citrobacter port...	1629	13000	99%	0.0	99.89%	5128136	CP109744.1
✓	Citrobacter freundii strain CH-GX-X014-5-2022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Citrobacter freu...	1629	1629	99%	0.0	99.89%	1452	OP788132.1
✓	Uncultured organism clone ELU0018-T230-S-NIPCRAMgANA_000252 small subunit ribosomal RNA ge...	uncultured orga...	1629	1629	99%	0.0	99.89%	1452	HQ744785.1
✓	Citrobacter freundii strain CH-GX-SL2-2-2021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Citrobacter freu...	1628	1628	99%	0.0	99.89%	1432	ON202712.1

Hình 9. Kết quả BLAST trình tự của mẫu vi khuẩn CM1 trên NCBI

Bảng 1. Các dòng TKT phân lập từ các tỉnh Kiên Giang, Cà Mau, Sóc Trăng

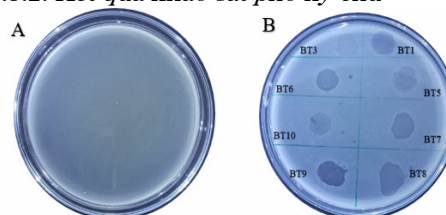
STT	Tên TKT	Nguồn gốc phân lập	Địa điểm phân lập	STT	Tên TKT	Nguồn gốc phân lập	Địa điểm phân lập
1	φNH1	Bùn ao cá bông lau	Huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng	31	φBT9	Bùn ao nuôi tôm	Huyện An Minh, tỉnh Kiên Giang
2	φNH2			32	φKN10		
3	φKN1			33	φKN11		
4	φKN2			34	φKN12		
5	φBT1			35	φKN13		
6	φNH3	Nước ao tôm sú	Huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng	36	φBT5	Bùn giữa ao tôm	Huyện Phú Tân, tỉnh Cà Mau
7	φNH4			37	φNH18		
8	φNH5			38	φNH19		
9	φKN3			39	φNH20		
10	φKN4			40	φNH21		
11	φNH6	Bùn đáy ao tôm tự nhiên	Huyện Phú Tân, tỉnh Cà Mau	41	φBT3	Nước ao sắp thả tôm	Huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng
12	φNH7			42	φBT2		
13	φNH8			43	φNH23		
14	φNH9			44	φNH24		
15	φBT6			45	φNH25		
16	φNH10	Nước ao tôm tự nhiên	Huyện Phú Tân, tỉnh Cà Mau	46	φNH26	Bùn ao tôm	Huyện An Minh, tỉnh Kiên Giang
17	φNH11			47	φNH27		
18	φNH12			48	φNH28		
19	φNH13			49	φNH29		
20	φBT7			50	φNH30		
21	φKN5	Nước ao nuôi tôm	Huyện Phú Tân, tỉnh Cà Mau	51	φKN14	Bùn ao lót bạc sâu (1,2 m)	Huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng
22	φKN6			52	φKN15		
23	φKN7			53	φKN16		
24	φKN8			54	φKN17		
25	φKN9			55	φKN18		
26	φBT8	Bùn ao tôm tự nhiên	Huyện Phú Tân, tỉnh Cà Mau	56	φKN19	Nước ao sắp thả cá	Huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng
27	φNH14			57	φKN29		
28	φNH15			58	φNH22		
29	φNH16			59	φBT4		
30	φNH17			60	φBT10		

3.3. Kết quả đánh giá khả năng xâm nhiễm của các dòng TKT vào vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus*

3.3.1. Đánh giá khả năng xâm nhiễm của TKT bằng phương pháp thử nghiệm vết tan

Đánh giá khả năng xâm nhiễm của 60 dòng TKT vào vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* bằng phương pháp khảo sát vết tan. Kết quả cho thấy, có 5 dòng TKT có khả năng cho vết tan trong trên nền khuẩn đục là: φBT1, φBT6, φBT7, φBT8 và φBT9. Bên cạnh đó, 3 dòng TKT: φBT3, φBT5 và φBT10 cũng cho vết tan nhưng đục hơn và không ổn định (Hình 10).

3.3.2. Kết quả khảo sát phổ ký chủ



Hình 10. Khả năng xâm nhiễm của TKT vào vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus*

Ghi chú: A: Đối chứng vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus*; B: Khả năng xâm nhiễm của 8 dòng thực khuẩn thể vào vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus*.

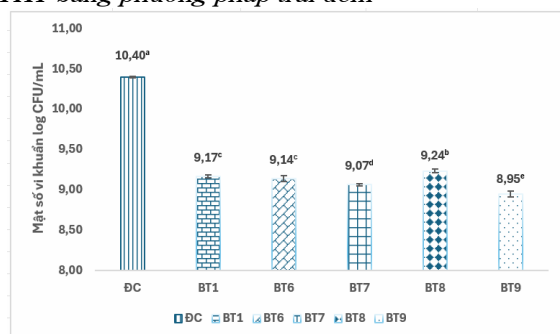
Phổ ký chủ của 8 dòng thực khuẩn thể phân lập và 8 dòng TKT kết hợp đối với vi khuẩn ký chủ là các dòng vi khuẩn: *Salmonella* ATCC 49223, *Salmonella* ATCC 14028 và *E. coli* ATCC 25922, *Citrobacter meridianamericanus* được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Phổ ký chủ của các dòng TKT

STT	Tên TKT	<i>S. enteritidis</i> ATCC 49223	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Citrobacter meridianamericanus</i>
1	φBT1	-	-	-	++
2	φBT5	-	+	-	+
3	φBT3	-	-	++	+
4	φBT6	+	+	+	++
5	φBT7	+	+	+	++
6	φBT8	+	+	-	++
7	φBT9	+	+	+	++
8	φBT10	-	-	-	+
9	Mix φBT5+φBT1	+	+	+	+
10	Mix φBT5+φBT10	+	+	+	+
11	Mix φBT7+φBT9	-	-	-	++
12	Mix φBT3+φBT10	+	+	+	+
13	Mix φBT3+φBT9	+	-	+	+
14	Mix φBT5+φBT7	-	-	-	+
15	Mix φBT1+φBT10	+	+	+	+
16	Mix φBT5+φBT3	-	-	-	+

Ghi chú: (++) Xuất hiện vết tan trong; (+) Xuất hiện vết tan đục; (-) Không xuất hiện vết tan.

3.3.3. Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn của TKT bằng phương pháp trải đếm

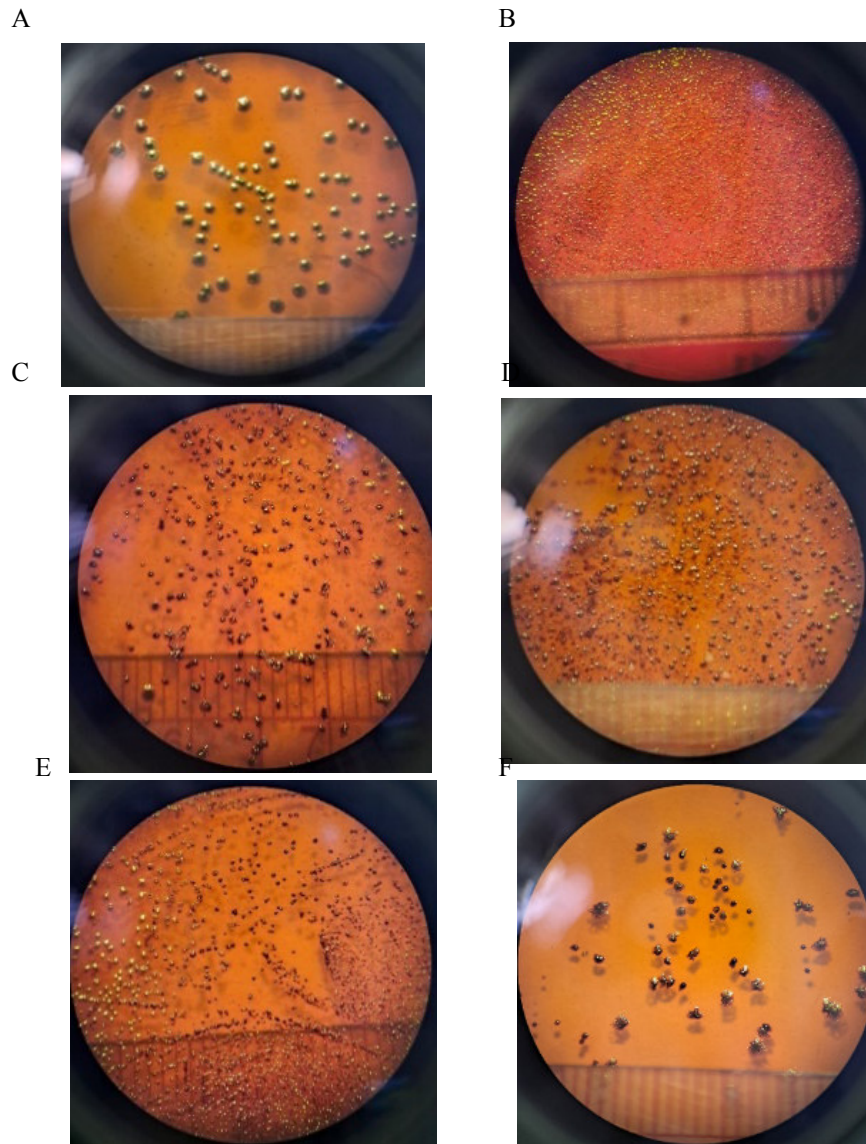


Hình 11. Mật số vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* có và không có chủng TKT ($p < 0,05$)

Ghi chú: ĐC: Đối chứng vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus*; BT1: *Citrobacter meridianamericanus* + TKT φBT1; BT6: *Citrobacter meridianamericanus* + TKT φBT6; BT7: *Citrobacter meridianamericanus* + TKT φBT7; BT8: *Citrobacter meridianamericanus* +

TKT φBT8; BT9: *Citrobacter meridianamericanus* + TKT φBT9.

Kết quả ở hình 11 cho thấy, cả 5 dòng: TKT φBT1, φBT6, φBT7, φBT8 và φBT9 đều làm giảm mật số vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus*. Theo đó, vi khuẩn đối chứng thì mật số khuẩn lạc là 10,40 log CFU/mL. Khi có bổ sung TKT φBT1, φBT6, φBT7, φBT8 và φBT9 thì mật số khuẩn lạc lần lượt là 9,17 log CFU/mL, 9,14 log CFU/mL, 9,07 log CFU/mL, 9,24 log CFU/mL và 8,95 log CFU/mL. TKT φBT9 có khả năng làm giảm mật số khuẩn lạc nhiều nhất, giảm 1,45 log CFU/mL và TKT φBT8 có mật độ vi khuẩn giảm thấp nhất, giảm 1,16 log CFU/mL, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$). Kết quả này thể hiện dòng TKT φBT9 có hiệu quả ức chế vi khuẩn hiệu quả hơn các các dòng TKT còn lại.



Hình 12. Hình thái của khuẩn lạc trước và sau khi vi khuẩn ký chủ *Citrobacter meridianamericanus* tương tác với TKT ϕ BT1, ϕ BT6, ϕ BT7, ϕ BT8, ϕ BT9 được quan sát dưới kính nhìn nổi

Ghi chú: A: Vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus*; B: Vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* + TKT BT1; C: Vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* + TKT ϕ BT6; D: Vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* + TKT ϕ BT7; E: Vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* + TKT ϕ BT8; F: Vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* + TKT ϕ BT9.

Bên cạnh việc làm thay đổi mật số vi khuẩn thì cả 5 dòng TKT: ϕ BT1, ϕ BT6, ϕ BT7, ϕ BT8 và ϕ BT9 đều làm thay đổi hình dạng và kích thước khuẩn lạc của dòng vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* sau 24 giờ trải trên môi trường EMB (Hình 12).

Hình 12.A cho thấy, khuẩn lạc vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* trên môi trường EMB có màu ánh kim, hình tròn, khuẩn lạc có độ lồi, bìa nguyên và kích thước khuẩn lạc khoảng 2 - 3 mm. Đối với vi khuẩn có bổ sung TKT ϕ BT1, ϕ BT6, ϕ BT7, ϕ BT8 và ϕ BT9 (Hình 12.B, C, D, E, F), hình thái khuẩn lạc có sự thay đổi so với khuẩn

lạc trên đĩa đối chứng, khuẩn lạc một phần bị mất màu ánh kim đặc trưng, từ đó có thể quan sát thấy vẻ ngoài đen bóng như chất nhầy của vi khuẩn biểu hiện trên khuẩn lạc, phần rìa khuẩn lạc từ dạng nguyên trở thành dạng gợn sóng, kích thước khuẩn lạc nhỏ lại.

4. KẾT LUẬN

Phân lập được một dòng vi khuẩn CM1 ở bùn đáy ao tôm tại tỉnh Cà Mau. Xác định được mẫu vi khuẩn CM1 là dòng vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* thông qua các thử nghiệm sinh lý, sinh hóa và giải trình tự. Bên cạnh đó, việc sử dụng các thực khuẩn thể kết hợp có thể làm tăng khả năng kiểm soát vi khuẩn.

Phân lập được 5 dòng TKT có khả năng lây nhiễm đối với dòng vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* và chọn 5 dòng TKT: ϕ BT1, ϕ BT6, ϕ BT7, ϕ BT8 và ϕ BT9 để thực hiện thí nghiệm khảo sát mật độ vi khuẩn, trong đó TKT ϕ BT9 làm giảm mật số vi khuẩn *Citrobacter meridianamericanus* cũng như thay đổi hình dạng của khuẩn lạc.

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. Jabeen, I., Islam, S., Hassan, A. K. M. I., Tasnim, Z. & Shuvo, S. R. (2023). A brief insight into *Citrobacter* species - A growing threat to public health. *Frontiers in Antibiotics*, Vol 2: 1276982. doi: 10.3389/frabi.2023.1276982
3. Homeier-Bachmann, T., Heiden, S. E., Lübcke, P. K., Bachmann, L., Bohnert, J. A., Zimmermann, D. & Schaufler, K. (2021). Antibiotic-Resistant *Enterobacteriaceae* in Wastewater of Abattoirs. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(5), 568. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050568>
4. 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7858-0>
5. Ribeiro, J. M., Pereira, G. N., Durli Junior, I., Teixeira, G. M., Bertozzi, M. M., Verri, W. A., Kobayashi, R. K. T. & Nakazato, G. (2023). Comparative analysis of effectiveness for phage cocktail development against multiple *Salmonella* serovars and its biofilm control activity. *Scientific Reports*, 13, 13054. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40228-z>
6. 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 & Biotechnology*, 11(6): 59 - 65. <http://doi.org/10.7324/JABB.2023.63868>
7. Li H, Li L, Chi Y, Tian Q, Zhou T, Han C, Zhu Y, Zhou Y. (2020). Development of a standardized Gram stain procedure for bacteria and inflammatory cells using an automated staining instrument. *Microbiologyopen*, 9(9): e1099. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1099>
8. Aryal, S. (2023). Oxidase test - principle, uses, procedure, types, result interpretation, examples and limitations. Microbiology Info.com. Available: <https://microbiologyinfo.com/oxidase-test-principle-uses-procedure-types-result-interpretation-examples-and-limitations/>
9. Kyule, D. N., Maingi, J. M., Njeru, E. M. & Nyamache, A. K. (2022). Molecular characterization and diversity of bacteria isolated from fish and fish products retailed in Kenyan Markets. *International Journal of Food Science*, Article ID 2379323, 12 pages <https://doi.org/10.1155/2022/2379323>

10. Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Bacteriophages: Methods and Protocols*, 501, 69 - 76.

ISOLATE BACTERIA AND BACTERIOPHAGE FROM SHRIMP POND AND INVESTIGATING THE EFFECTS OF PHAGE COCKTAIL AGAINST *Citrobacter meridianamericanus*

Truong Thi Bich Van¹, Ha Thi Bao Tran¹, Nguyen Pham Anh Thi¹

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

Summary

CM1 bacteria were isolated from shrimp pond bottom mud and identified as *Citrobacter meridianamericanus*. Surveying the host strains of eight isolated phages and eight phage cocktail against host strains such as *Salmonella* ATCC 49223, *Salmonella* ATCC 14028 and *E. coli* ATCC 25922, *Citrobacter meridianamericanus* observed ϕ BT3 gives soluble stains on host *E. coli* ATCC 25922 and 6 phages including ϕ BT1, ϕ BT6, ϕ BT7, ϕ BT8, ϕ BT9 and Mix ϕ BT7 + ϕ BT9 give soluble stains on host *Citrobacter* spp.. Based on that result 5 phages ϕ BT1, ϕ BT5, ϕ BT6, ϕ BT7 and ϕ BT9 were selected to evaluate the influence of phage on the colony population of *Citrobacter meridianamericanus* bacteria using the spread counting method. Evaluation results showed that all five bacteriophage strains reduced bacterial population with statistical significance and had specific effects on colony morphology. In which, ϕ BT9 has the greatest ability to reduce bacterial density, down to 1.45 log CFU/mL and ϕ BT8 has the lowest bacterial density reduction of 1.16 log CFU/mL. The results showed that the ϕ BT9 line had the best effectiveness in controlling bacteria. Besides, the combination of two phage strains increases the ability to inhibit bacteria and limit the resistance of bacteria to bacteriophages.

Keywords: *Citrobacter meridianamericanus*, bacteriophage, phage cocktail, host strains, plaque.

Ngày nhận bài: 15/4/2024

Ngày chuyển phản biện: 25/4/2024

Ngày thông qua phản biện: 10/6/2024

Ngày duyệt đăng: 19/8/2024