

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trịnh Thu Trang

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN THỰC KHUẨN THỂ
LY GIẢI ĐẶC HIỆU *Bacillus cereus* GÂY NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

Hà Nội - Năm 2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trịnh Thu Trang

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN THỰC KHUẨN THỂ
LY GIẢI ĐẶC HIỆU *Bacillus cereus* GÂY NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số : 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC**
NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
PGS. TS. Đồng Văn Quyền

Hà Nội - Năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài: **“Nghiên cứu phân lập tuyển chọn thực khuẩn thể ly giải đặc hiệu *Bacillus cereus* gây ngộ độc thực phẩm”** là do tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Đồng Văn Quyền dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực, nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận văn

Trịnh Thu Trang

LỜI CẢM ƠN

Với lòng biết ơn sâu sắc, trước tiên tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất tới PGS.TS. Đồng Văn Quyền, là người thầy đã trực tiếp hướng dẫn, định hướng nghiên cứu và chỉ bảo tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài tại phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến các cán bộ nghiên cứu tại phòng Vi sinh vật học phân tử đã tận tình chỉ bảo và truyền đạt nhiều kinh nghiệm thực tiễn quý giá trong hoạt động nghiên cứu khoa học ở lĩnh vực vi sinh vật học.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban giám đốc, các thầy, cô giáo thuộc Khoa Công nghệ sinh học, Phòng Đào tạo, Quản lý Khoa học và Hợp tác quốc tế của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện, dạy bảo và truyền đạt cho em nhiều kiến thức trong quá trình học tập tại Học viện.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn gia đình, bạn bè và người thân đã luôn động viên và là hậu phương vững chắc giúp tôi có kết quả như ngày hôm nay.

Tác giả luận văn

Trịnh Thu Trang

MỤC LỤC

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	i
DANH MỤC CÁC BẢNG	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	iii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	2
1.1. Tổng quan về vi khuẩn <i>Bacillus cereus</i>	2
1.1.1. Phân loại.....	2
1.1.2. Đặc điểm hình thái của <i>Bacillus cereus</i>	3
1.1.3. Tình hình ngộ độc thực phẩm do <i>Bacillus cereus</i>	5
1.1.4. Các yếu tố gây độc của <i>Bacillus cereus</i>	8
1.2. Tổng quan về thực khuẩn thể	9
1.2.1. Lịch sử phát hiện và nghiên cứu.....	9
1.2.2. Hình thái và phân loại	10
1.2.3. Sự nhân lên của thực khuẩn thể trong tế bào vật chủ.....	11
1.2.4. Một số nghiên cứu và ứng dụng	12
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	17
2.1.1. Hóa chất.....	17
2.1.2. Trang thiết bị	17
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.2.1. Phương pháp phân lập thực khuẩn thể.....	18
2.2.2. Khảo sát phổ vật chủ của thực khuẩn thể	20
2.2.3. Xác định tỷ lệ lây nhiễm của thực khuẩn thể.....	20
2.2.4. Xây dựng đường cong sinh trưởng của thực khuẩn thể	20
2.2.5. Phân loại chủng thực khuẩn thể được tuyển chọn	21
2.2.6. Nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến sự ổn định của TKT ...	21
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	23
3.1. Kết quả phân lập TKT.....	23
3.2. Kết quả xác định phổ vật chủ của TKT	26

3.3.	Kết quả quan sát hình thái TKT qua TEM.....	29
3.4.	Kết quả xác định hệ số đa nhiễm virus (MOI) <i>in vitro</i>	30
3.5.	Kết quả xây dựng đường cong sinh trưởng đơn bậc	32
3.6.	Kết quả xác định các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến tính ổn định của TKT 24	34
3.6.1.	Kết quả xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự ổn định của TKT	34
3.6.2.	Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự ổn định của TKT	37
3.6.3.	Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tia cực tím đến TKT	39
3.6.4.	Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến tính ổn định của TKT	41
	KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	45
	DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	46

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tên đầy đủ	Tên Tiếng Việt
CFU	Colony Forming Units	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
DNA	Deoxyribonucleotide acid	
dsDNA	Double strand DNA	DNA sợi đôi
dsRNA	Double strand RNA	RNA sợi đôi
ESPA	European Food Safety Authority	Cơ quan An toàn thực phẩm Châu Âu
FDA	Food and Drug Administration	Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ
GRAS	Generally Recognized As Safe	Chứng nhận an toàn tuyệt đối
LB	Luria – Bertani	
MOI	Multiplicity of infection	Tỷ lệ lây nhiễm trùng
MPA	Meat – Pepton – Agar	Môi trường Thịt – Pepton – Agar
MYP	Manitol – Yolk – Polimyxin	Môi trường Manitol – Lòng đỏ trứng - Polimyxin
NBY	Nutrient Broth Yeast extract	Môi trường dinh dưỡng chiết xuất nấm men
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
PFU	Plaque Forming Units	Đơn vị hình thành vết tan
RNA	Ribonucleic Acid	
rRNA	Ribosome ribonuclease	
sDNA	Single strand DNA	DNA sợi đơn
SM	Sodium chloride, Magnesium sulphate	Đệm NaCl-MgSO ₄
sRNA	Single strand RNA	RNA sợi đơn
TEM	Transmission electron microscopy	Kính hiển vi điện tử truyền qua
TKT		Thực khuẩn thể
USDA	United States Department of Agriculture	Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ
UV	Ultra Violet	Tia cực tím
VP	Voges - Proskauer	
VTCC	Vietnam Type Culture Collection	Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1. 1. Đặc điểm sinh hóa của <i>B. cereus</i> so sánh với các loài <i>Bacillus</i> khác có họ hàng gần	5
Bảng 1. 2. Một số trường hợp ngộ độc thực phẩm do <i>B.cereus</i> được báo cáo trên thế giới và Việt Nam	7
Bảng 1. 3. Một số nghiên cứu ứng dụng TKT trên động vật nuôi và cây trồng	14
Bảng 1. 4. Một số nghiên cứu về việc sử dụng TKT để kiểm soát vi khuẩn trong thực phẩm	15
Bảng 3. 1. Tỷ lệ phân lập TKT từ mẫu nghiên cứu	25
Bảng 3. 2. Phổ vật chủ của 17 dòng TKT phân lập.....	27

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1. 1. Tế bào vi khuẩn <i>Bacillus cereus</i> quan sát qua kính hiển vi	4
Hình 1. 2. Hình thái khuẩn lạc <i>B. cereus</i>	4
Hình 1. 3. Hình ảnh biểu thị cấu trúc virion.....	10
Hình 1. 4. Chu kỳ sinh tan và tiềm tan của thực khuẩn thể	12
Hình 3. 1. Hình ảnh mẫu nghiên cứu được sử dụng để phân lập TKT.....	23
Hình 3. 2. Một số kết quả phân lập TKT	24
Hình 3. 3. Một số hình ảnh thí nghiệm khảo sát phổ vật chủ	28
Hình 3. 4. Hình thái TKT 24 được soi bằng TEM khung tỉ lệ 100 nm	29
Hình 3. 5. Kết quả xác định tỷ lệ lây nhiễm (MOI).....	31
Hình 3. 6. Đường cong sinh trưởng của TKT 24.....	32
Hình 3. 7. Kết quả khảo sát điều kiện nhiệt độ ảnh hưởng đến TKT 24	35
Hình 3. 8. Kết quả khảo sát nhiệt độ lạnh TKT 24.....	35
Hình 3. 10. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của UV đối với sự ổn định của TKT	40
Hình 3. 11. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến tính ổn định của TKT.....	43

MỞ ĐẦU

Ngộ độc thực phẩm do nhiễm vi sinh vật đang là một vấn đề nghiêm trọng trên toàn thế giới, ảnh hưởng nặng nề đến sức khỏe cộng đồng và nền kinh tế. Theo tổ chức y tế thế giới (WHO), hàng năm trên thế giới (bao gồm cả Việt Nam) xảy ra khoảng 600 triệu ca ngộ độc thực phẩm, gây ra cái chết của khoảng 420.000 người mỗi năm, trong đó số ca ngộ độc do vi sinh vật gây ra chiếm tới 66%. Trong số các tác nhân vi sinh vật, *Bacillus cereus* là một trong những tác nhân gây hư hỏng thực phẩm phổ biến nhất. Chúng là những vi khuẩn gram dương, hình que, có khả năng hình thành bào tử và sinh độc tố gây ngộ độc với hai thể bệnh là thể tiêu chảy và thể gây nôn. *B. cereus* có mặt trong bùn đất, nước thải và các loại thực phẩm như sữa, thịt, rau củ ... Hiện nay, một số phương pháp đã được áp dụng trong quá trình bảo quản và chế biến thực phẩm nhằm ức chế vi khuẩn bao gồm các phương pháp xử lý vật lý (nhiệt, áp suất, tia UV ...), phương pháp hóa học hay sử dụng kháng sinh. Tuy nhiên, các phương pháp này có thể làm thay đổi các đặc tính cảm quan và chất lượng của thực phẩm hoặc ảnh hưởng đến sức khỏe của người tiêu dùng do dư lượng kháng sinh trong thực phẩm. Do đó việc tìm ra phương pháp mới hiệu quả và an toàn hơn trong bảo quản và chế biến thực phẩm là vấn đề đang rất được quan tâm. Liệu pháp thực khuẩn thể sử dụng các vi rút có khả năng ly giải vi khuẩn (bacteriophage) được xem là liệu pháp hiệu quả do có tính đặc hiệu cao, chi phí thấp, an toàn, thân thiện với môi trường. Từ thực tế trên, chúng tôi thực hiện đề tài “**Nghiên cứu phân lập tuyển chọn thực khuẩn thể ly giải đặc hiệu *Bacillus cereus* gây ngộ độc thực phẩm**” hướng đến mục tiêu sản xuất và ứng dụng thực khuẩn thể để kiểm soát *B. cereus*.

Mục đích nghiên cứu: Phân lập và sàng lọc được chủng thực khuẩn thể có khả năng ly giải đặc hiệu với các chủng vi khuẩn *Bacillus cereus*.

Nội dung nghiên cứu:

Nội dung 1: Phân lập, sàng lọc và tuyển chọn thực khuẩn thể có khả năng ly giải các chủng vi khuẩn *Bacillus cereus*.

Nội dung 2: Nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến sự ổn định thực khuẩn thể.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về vi khuẩn *Bacillus cereus*

B. cereus không chỉ là tác nhân gây hư hỏng thực phẩm mà còn được biết đến rộng rãi với khả năng gây ngộ độc thực phẩm. Các báo cáo hàng năm của Cơ quan An toàn thực phẩm Châu Âu (ESPA) cũng cho thấy *B. cereus* là một trong các tác nhân gây ngộ độc thực phẩm hàng đầu chỉ sau *Clostridium botulinum*, *Salmonella* và virus [1]. Trong vòng 5 năm, 2011-2015, có gần 300 vụ bùng phát ngộ độc thực phẩm do *B. cereus* đã được báo cáo ở các quốc gia Châu Âu [1]. Theo các khảo sát được thực hiện tại Hoa Kỳ, có hơn một triệu ca bệnh liên quan đến thực phẩm mỗi năm là do độc tố vi khuẩn, bao gồm cả *B. cereus*. Một báo cáo gần đây của Pháp cho rằng *B. cereus* là một trong những nguyên nhân quan trọng nhất gây ngộ độc thực phẩm tại nước này [2]. Tại Trung Quốc, *B. cereus* được ghi nhận là tác nhân gây bệnh đứng thứ hai với hơn 4000 ca được báo cáo [2].

Tại Việt Nam, ngộ độc thực phẩm đang là một vấn đề nhức nhối, đã có 1.604 vụ ngộ độc được ghi nhận từ năm 2010 đến năm 2020, nguyên nhân gây ngộ độc chủ yếu do vi sinh vật (chiếm 38,7%), *B. cereus* được xem là một trong những nguyên nhân chính [3]. Việc tìm hiểu đặc điểm, cấu trúc của loài vi khuẩn này mang ý nghĩa quan trọng trong việc hỗ trợ tìm phương pháp ngăn ngừa, hạn chế những trường hợp mắc bệnh do *B. cereus*.

1.1.1. Phân loại

Phân loại quốc tế *B. cereus*:

- Thuộc giới: Bacteria
 - Ngành (phylum): *Firmicutes*
 - Lớp (class): *Bacilli*
 - Bộ (order): *Bacillales*
 - Họ (family): *Bacillaceae*
 - Chi (genus): *Bacillus*
 - Loài (species): *B. cereus*

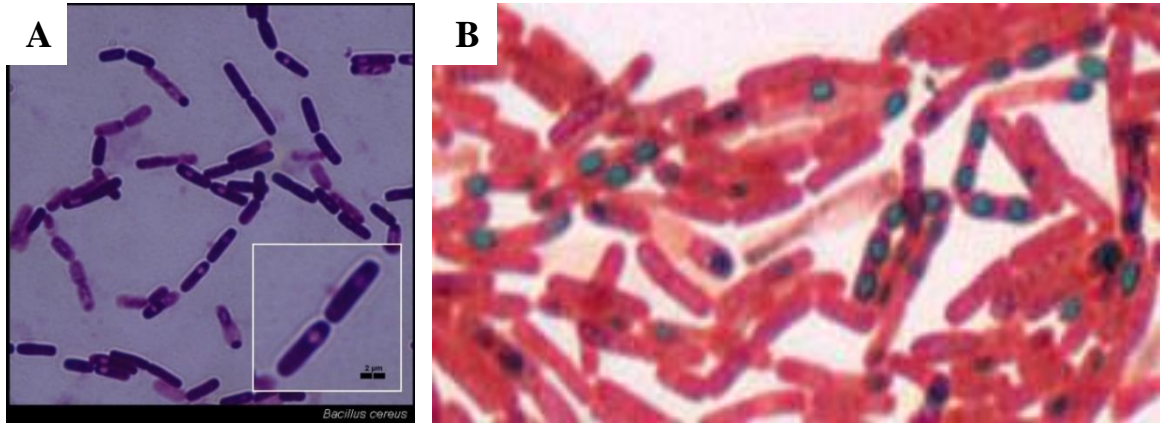
Thuật ngữ “*Bacillus*” có nghĩa là “hình que”, trong khi từ “*ceruus*” trong tiếng Latin chỉ sự “giống sáp”, theo đó, kiểu hình của *B. cereus* có thể dễ dàng nhận biết qua quan sát khuẩn lạc trên đĩa thạch agar hoặc các môi trường chọn lọc khác [4]. Ban đầu, nó được phân lập từ không khí trong một chuồng

bò bởi Frankland vào năm 1887 và sau đó được phát hiện bởi Plazikowski vào năm 1906 qua các ca ngộ độc thực phẩm tại Châu Âu [5]. Chi *Bacillus* được hình thành vào năm 1920 và đã trải qua nhiều thay đổi lớn trong nhiều thập kỉ qua. Đặc điểm kiểu hình giữa các loài khác nhau là khác nhau, do đó, chúng được sử dụng để phân loại (ví dụ khả năng di chuyển, tán huyết...). Ngoài ra, việc phân loại còn dựa vào đặc điểm sinh hóa, cụ thể là khả năng sản xuất độc tố bệnh than/protein hình nón, protein tinh thể diệt côn trùng và protein synthetase của độc tố gây nôn (cereulide). Những đặc điểm này có thể mất đi, không đồng nhất trong cùng một loài hoặc hiện diện cùng lúc ở nhiều loài, vì vậy, có thể gây khó khăn trong việc phân loại [6].

1.1.2. Đặc điểm hình thái của *Bacillus cereus*

Hình thái tế bào vi khuẩn

Vi khuẩn *B. cereus* có hình que mảnh thẳng hoặc hơi cong; kích thước tế bào rộng 1,0 – 1,2 μm , dài 3,0 – 5,0 μm , tế bào xuất hiện đơn lẻ hoặc tạo thành chuỗi ngắn khi quan sát dưới kính hiển vi (Hình 1.1A). Nhiều chủng thuộc *B.cereus* có khả năng di động nhờ các tiên mao, di chuyển chậm. *B. cereus* có khả năng hình thành bào tử hình elip hoặc hình trụ mà không làm phồng tế bào; bào tử xuất hiện có màu xanh lục trong tế bào sinh dưỡng màu đỏ qua phương pháp nhuộm bào tử bào Schaeffer-Fulton (Hình 1.1B). Bào tử của *B. cereus* có khả năng chống chịu tốt ở các điều kiện môi trường cực đoan như nhiệt độ, tia cực tím, pH hoặc môi trường nghèo dinh dưỡng, cũng như có khả năng đề kháng các hóa chất khử nhiễm, dung dịch ion, ozon. Chính vì khả năng này nên *B.cereus* được tìm thấy ở hầu hết mọi nơi, nhiều loại môi trường sống, do đó việc ô nhiễm thực phẩm bởi vi khuẩn này là khó có thể tránh khỏi [7].



Hình 1. 1. Tế bào vi khuẩn *Bacillus cereus* quan sát qua kính hiển vi

(Nguồn: Microbiologyinpictures.com)

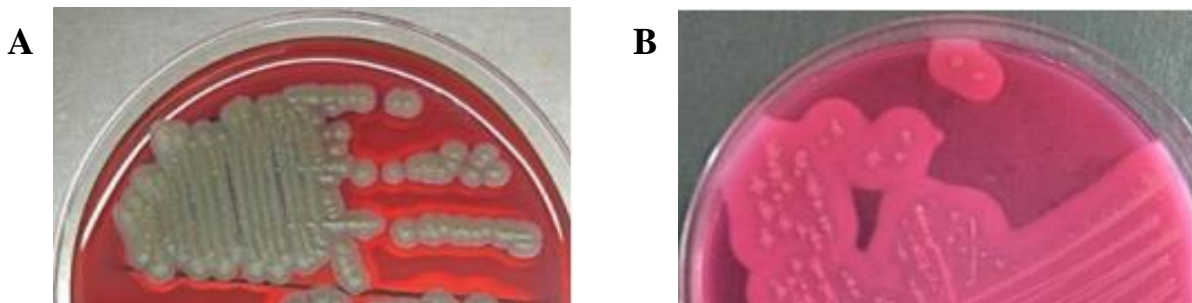
(A) Tế bào quan sát dưới kính hiển vi

(B) Tế bào được nhuộm bào tử bằng phương pháp Schaeffer-Fulton

Hình thái khuẩn lạc

Là loại vi khuẩn dễ phát triển trên các môi trường nuôi cấy vi khuẩn thông thường: *B. cereus* có thể sinh trưởng ở dải nhiệt độ rất rộng từ 10 - 48°C, tối ưu nhất là 28 - 35°C. Độ pH từ 4,9 - 9,3, tối ưu nhất cho sự phát triển của vi khuẩn là 7 - 7,2 và hoạt độ nước từ 0,92 đến 1,0.

B. cereus hình thành khuẩn lạc lớn (3 - 8 mm), màu xám, bề mặt phẳng, thường có rìa gồ ghề, vòng tan huyết β xung quang khuẩn lạc trên môi trường thạch máu cừu (Hình 1.2A); trên môi trường MYPA (Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin đỏ), *B. cereus* có khuẩn lạc nhỏ (2 - 3 mm), rìa răng cưa, màu đỏ hồng, xung quanh có vòng đục do thủy phân lecithin lòng đỏ trứng (Hình 1.2B)



Hình 1. 2. Hình thái khuẩn lạc *B. cereus*

(A) *B. cereus* trên môi trường thạch máu cừu

(B) *B. cereus* trên môi trường MYPA

Đặc điểm sinh hóa

Để phân biệt *B. cereus* với các vi khuẩn trong *Bacillus* nhóm 1 (*B. anthracis*, *B. thuringiensis* ...) dựa trên các thử nghiệm sinh hóa với các đặc điểm được trình bày trong bảng sau:

Bảng 1.1. Đặc điểm sinh hóa của *B. cereus* so sánh với các loài *Bacillus* khác có họ hàng gần

Đặc tính	Loài		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
Kỵ khí	+	+	+
Sinh Catalase	+	+	+
Thủy phân Casein	+	+	+
Khử Nitrate	+	+	+
Phản ứng Voges – Proskauer	+	+	+
Sinh trưởng ở NaCl 7%	+	+	+
Sinh trưởng ở 60°C	-	-	-
Sử dụng glucose	+	+	+
Di động	+*	-	+*
Tán huyết trên thạch máu cừu	+*	-	+*
Kháng kháng sinh β -lactam	+*	-	+*
Tạo tinh thể protein độc	-	-	+

Chú thích: + phản ứng dương tính; +* hơn 95% chủng có phản ứng dương tính; - phản ứng âm tính.

1.1.3. Tình hình ngộ độc thực phẩm do *Bacillus cereus*

B. cereus được xác nhận là sinh vật gây bệnh đường tiêu hóa vào năm 1947 khi nhiều người bị tiêu chảy phải nhập viện tại Na Uy sau khi ăn sốt vani [8]. 20 năm sau, dạng bệnh nôn mửa được mô tả khi có các trường hợp ngộ độc thực phẩm xuất hiện ở Anh sau khi ăn cơm chín. Đó cũng là lần đầu tiên người ta công nhận rằng *B. cereus* tạo ra ít nhất hai loại độc tố khác nhau là nguyên nhân gây ra tiêu chảy hoặc nôn [9]. Tại Nhật Bản, tổng số có 5.141 vụ ngộ độc thực phẩm đã xảy ra giữa năm 1982 và 1986; trong số đó, số vụ

gây ra bởi nhiễm vi sinh vật là 3.740 vụ, *B. cereus* gây ra 73 vụ. Trong khoảng thời gian 10 năm, năm 1986 đến năm 1995, đã diễn ra 852 vụ bùng phát ngộ độc thực phẩm, 26.173 ca mắc bệnh và 20 ca tử vong được báo cáo ở Đài Loan. Trong số các ca bệnh này có 555 trường hợp (chiếm 65% số ca mắc) là ngộ độc do nhiễm vi sinh vật. Loại vi khuẩn gây bệnh thứ ba trong số những vụ ngộ độc này là *B. cereus* (chiếm 18% số các trường hợp). Khi tóm tắt dữ liệu về các bệnh do tiêu dùng thực phẩm và sản phẩm thịt của Trung Quốc từ năm 1991 đến năm 1994 của Cơ quan Thanh tra Thực phẩm khu vực Hà Lan, Simone và cộng sự (1997) đã báo cáo 2.621 vụ ngộ độc, trong đó có 7.567 người bị bệnh. Trong số các tác nhân gây bệnh đã biết, *B. cereus* ở mức cao nhất, chiếm 19% [10]. Theo báo cáo mới nhất của Cơ quan An toàn Thực phẩm Châu Âu (2007) về sự bùng phát dịch bệnh, *B. cereus* là tác nhân gây ra 77 vụ dịch và gây ra 17,1% trường hợp do độc tố vi khuẩn. Tại Việt Nam, việc ngộ độc do *B. cereus* đã không còn mới lạ. Tháng 1 năm 2021, vụ ngộ độc tập thể do *B. cereus* gây ra tại một khu công nghệ thuộc tỉnh Phú Yên đã khiến 80 công nhân phải nhập viện điều trị, đây chỉ là một trong vô số những ca ngộ độc thực phẩm xảy ra tại Việt Nam nguyên nhân từ loại vi khuẩn gây bệnh này.

Phần lớn các ca ngộ độc thực phẩm do *B.cereus* không được báo cáo. Nguyên nhân là do triệu chứng bệnh ngắn và nhẹ nên các bệnh nhân thường không đi khám. Hơn nữa, các trường hợp ngộ độc do *B.cereus* thường bị nhầm lẫn vì triệu chứng của bệnh nôn mửa khó phân biệt với các triệu chứng nhiễm độc do *S.aureus* và bệnh tiêu chảy có các triệu chứng giống với *C. perfringens* loại A [4]. Ngoài ra, sự khác biệt lớn về hệ thống giám sát và báo cáo giữa các quốc gia nên rất khó để so sánh dữ liệu và ước tính tỷ lệ mắc bệnh thực sự.

Các ví dụ về các trường hợp và các đợt bùng phát ngộ độc liên quan đến *B.cereus* được trình bày trong Bảng 1.2

Bảng 1. 2. Một số trường hợp ngộ độc thực phẩm do *B.cereus* được báo cáo trên thế giới và Việt Nam

Năm	Địa điểm	Loại thực phẩm	Hệ quả	Tài liệu tham khảo
1955	Na Uy	Sốt vani	4 vụ bùng phát, hơn 400 bệnh nhân với triệu chứng đau bụng, tiêu chảy	[8]
1975	Phần Lan	Cơm	18 bệnh nhân với triệu chứng buồn nôn, nôn mửa, đau bụng	[11]
1986	Mỹ	Cơm và thịt gà trong nhà ăn bệnh viện	160 nhân viên nhập viện	[12]
1985	Mỹ	Thịt bò hầm	23 người mắc bệnh	[13]
2000	Ý	Bánh kem	173 bệnh nhân	[14]
2007	Đức	Bánh pudding gạo	Gây ngộ độc ở 43 trẻ em và 3 người lớn	[15]
2008	Oman	Suất ăn bệnh viện	58 bệnh nhân	[16]
2012	Việt Nam	Suất ăn bán trú tại trường học	30 em học sinh mầm non bị ngộ độc	[17]
2014	Trung Quốc	Đậu đen lên men	139 bệnh nhân	[18]
2007- 2014	Pháp	Thực phẩm giàu tinh bột và rau củ	74 vụ bùng phát	[2]
2003- 2013	Brazil	Ngũ cốc, nước sốt	346 bệnh nhân	[19]
2021	Việt Nam	Suất ăn công nghiệp	80 công nhân phải nhập viện	[20]

1.1.4. Các yếu tố gây độc của *Bacillus cereus*

B. cereus được biết đến có khả năng gây ngộ độc thực phẩm với hai thể bệnh điển hình là nôn mửa và tiêu chảy.

Đối với thể bệnh tiêu chảy

Ba độc tố ruột đã được chứng minh là có liên quan đến hội chứng này. Hemolysin BL (Hbl) là một phức hợp độc tố ruột ba thành phần bao gồm các protein L1, L2 và B (được mã hóa tương ứng bởi các gen hblD, hblC trong một operon nằm trên nhiễm sắc thể). Như tên gọi của nó, độc tố ruột này có khả năng làm tan máu và gây ra sự ly giải thẩm thấu bằng cách hình thành một lỗ xuyên màng, sau khi liên kết độc lập với ba thành phần của nó. Độc tố ruột không phân giải (Nhe) cũng là một phức hợp ba protein bao gồm các protein NheA, NheB và NheC và được mã hóa bởi một operon nằm trên nhiễm sắc thể với các gen nheA, nheB và nheC. Nhe cũng gây độc tế bào và gây ra các lỗ rỗng xuyên màng và cấu trúc của Hbl và Nhe đã được chứng minh là có liên quan với nhau; cả hai đều cần cả ba thành phần để hoạt động sinh học tối đa. Độc tố ruột thứ ba là cytotoxin K (CytK) còn được gọi là EntK. Đây là một protein đơn được mã hóa bởi gen cytK nằm trên nhiễm sắc thể và là một độc tố hình thành lỗ rỗng khác [5].

Hội chứng tiêu chảy là do ăn phải các tế bào chứ không phải do độc tố đã tạo sẵn được ủng hộ bởi thực tế là độc tố không bền nhiệt, nhanh chóng bị phân hủy ở pH = 3 và bị thủy phân bởi các enzym phân giải protein của đường tiêu hóa. Tuy nhiên, vẫn có những lo ngại rằng ở trẻ nhỏ có axit dạ dày thấp, chất độc có thể được bảo vệ khỏi sự biến tính như vậy khi nó có trong chất nền thực phẩm [5].

Đối với thể gây nôn

Độc tố gây nôn được cho là một lipid không kháng nguyên và cực kỳ bền với nhiệt (90 phút ở 126 °C), pH acid và kiềm (pH 2 và 11) và với sự phân giải của protease trong đường tiêu hóa. Những đặc điểm này là điển hình của các độc tố được hình thành sẵn trong thực phẩm. Độc tố này có bản chất là một dodecadeptide có một vòng 4 acid amin với phân tử lượng 1,2 kDa và/ hoặc oxy acid có thành phần như sau: [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃.

Gần giống với ionophore kali, valinomycin, độc tố này là sản phẩm của

quá trình sinh tổng hợp không thông qua ribosome được mã hóa bởi cụm gen 24kb cereulide synthetase (ces) pBCE. Plasmid này cho thấy mối liên hệ với plasmid độc lực pXO1 của *B. anthracis*, củng cố mức độ gần gũi của nhóm *B. cereus* [21]. Gây nôn được tạo ra bằng cách liên kết của độc tố đã được tạo sẵn với các thụ thể 5-HT₃ kích thích dây thần kinh phế vị dẫn đến kích thích trung tâm nôn của não và gây ra phản xạ nôn, theo cách tương tự với độc tố ruột của *Staphylococcus*. Các triệu chứng có thể khó phân biệt với nhiễm độc do tụ cầu. Sự sản sinh độc tố gây nôn xảy ra trong phạm vi nhiệt độ 12–37°C nhưng nhiệt độ tối ưu là 12–15°C, phù hợp với tình trạng ngộ độc do thực phẩm không được bảo quản lạnh đúng cách [5].

1.2. Tổng quan về thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể (TKT) hay còn gọi là phage là các virus chỉ lây nhiễm vi khuẩn, gây ra sự ly giải tế bào vi khuẩn. Kể từ khi được phát hiện cách đây gần một thế kỉ trước, TKT đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực bao gồm y tế, nông nghiệp và thực phẩm.

1.2.1. Lịch sử phát hiện và nghiên cứu

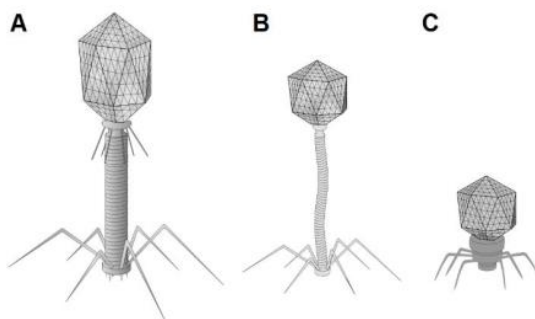
Lần đầu tiên Ernest Hankin (1896) và Nikolay Fyodorovich Gamaleya (1898) đã mô tả hoạt động kháng khuẩn của các chất chưa biết đối với *Vibrio cholerae* và *Bacillus subtilis*. Chất này có thể đi qua bộ lọc milipore, được biết là có thể giữ lại các vi sinh vật lớn hơn như vi khuẩn, Hankin đã công bố công trình của mình bằng tiếng Pháp trong Biên niên sử của Viện Pasteur [22]. Năm 1915, Frederick Twort đưa ra giả thuyết rằng hiệu ứng này có thể do virus gây ra, nhưng ông đã không tiến hành nghiên cứu để xác nhận điều đó [23]. Felix d’Herelle vào năm 1917, người đã chứng minh rằng hoạt động kháng khuẩn quan sát được là do virus có khả năng ký sinh và tiêu diệt vi khuẩn gây ra. Các tác nhân này được đặt tên là thực khuẩn thể, tên được hình thành từ các từ ‘vi khuẩn’ và “phagein” (nghĩa là “ăn” theo tiếng Hy Lạp). Theo Maura và Debarbieux (2011), nghiên cứu về thực khuẩn thể trong thế kỷ qua có thể được chia thành ba thời kỳ [24]. Giai đoạn đầu tiên là giai đoạn bắt đầu ngay sau khi phát hiện ra thực khuẩn thông qua ứng dụng y tế do d’Herelle đề xuất để điều trị bệnh tả và các bệnh đường ruột khác. Ông đã phát minh ra một kỹ thuật được gọi là “liệu pháp phage” [25]. Đồng thời, TKT cũng đã được sử dụng để kiểm soát bệnh trên cây trồng [26]. Các ứng

dụng này đã mở rộng khắp thế giới cho đến những năm 1940, khi chúng trở nên lỗi thời do sự ra đời của thuốc kháng sinh, chỉ còn được sử dụng ở một số nước Đông Âu và Liên Xô cũ [27]. Giai đoạn thứ hai bắt đầu vào những năm 1940, với một ứng dụng mới của thực khuẩn vào lĩnh vực di truyền dẫn đến sự xuất hiện của một ngành được gọi là “sinh học phân tử” [28]. Giai đoạn thứ ba bắt đầu cách đây 20 năm và liên quan đến các nghiên cứu về thực khuẩn thể tập trung vào chức năng sinh thái của chúng trong sinh quyển và ứng dụng của chúng để kiểm soát và xác định vi khuẩn [24].

1.2.2. Hình thái và phân loại

TKT là virus xâm nhiễm vi khuẩn và chúng phụ thuộc hoàn toàn vào các tài nguyên nội bào của tế bào vật chủ để sinh tồn và nhân lên, cho nên chúng được coi là ký sinh nội bào bắt buộc [29]. TKT là những virus có tính đặc hiệu cao vì chúng tấn công vào một loài cụ thể hoặc chỉ một chủng vi khuẩn đơn lẻ. Tuy nhiên, cũng có những TKT có thể lây nhiễm sang nhiều loại sinh vật chủ, gồm các loài khác nhau trong cùng một chi hoặc các thành viên của các chi khác thuộc cùng một họ [30].

Theo Ủy ban Quốc tế về phân loại virus, TKT có thể được phân loại dựa trên hình thái và loại vật liệu di truyền (dsDNA, sDNA, dsRNA, sRNA). Hầu hết các TKT được tìm thấy và mô tả cho đến nay thuộc bộ *Caudovirales* [31]. TKT thuộc bộ *Caudovirales* được phân thành 3 họ riêng biệt dựa trên hình thái đuôi của chúng: *Siphoviridae* có đuôi dài không co duỗi (chiếm 60% TKT đã biết), *Myoviridae* đuôi dài co duỗi (chiếm 25%) và *Podoviridae* có đuôi rất ngắn (15%) [32] (Hình 1.3)



Hình 1. 3. Hình ảnh biểu thị cấu trúc virion

(A) Họ *Myoviridae*; (B) Họ *Siphoviridae*; (C) Họ *Podoviridae*.

(Nguồn: Harald Eriksson, 2015) [33]

Cấu trúc của TKT có đuôi bao gồm vật liệu di truyền (DNA hoặc RNA) và vỏ capsid bao bọc acid nucleic. Đuôi của TKT được hình thành từ protein chịu trách nhiệm cho việc hấp phụ của chúng lên bề mặt vi khuẩn.

Các họ TKT không có đuôi cũng đã được mô tả, tuy nhiên có rất ít thành viên. Chúng được phân biệt bởi hình dạng (hình que, hình cầu), có lớp phủ lipit hoặc không, có DNA chuỗi đơn hoặc kép, hay RNA đơn hoặc kép [32].

1.2.3. Sự nhân lên của thực khuẩn thể trong tế bào vật chủ

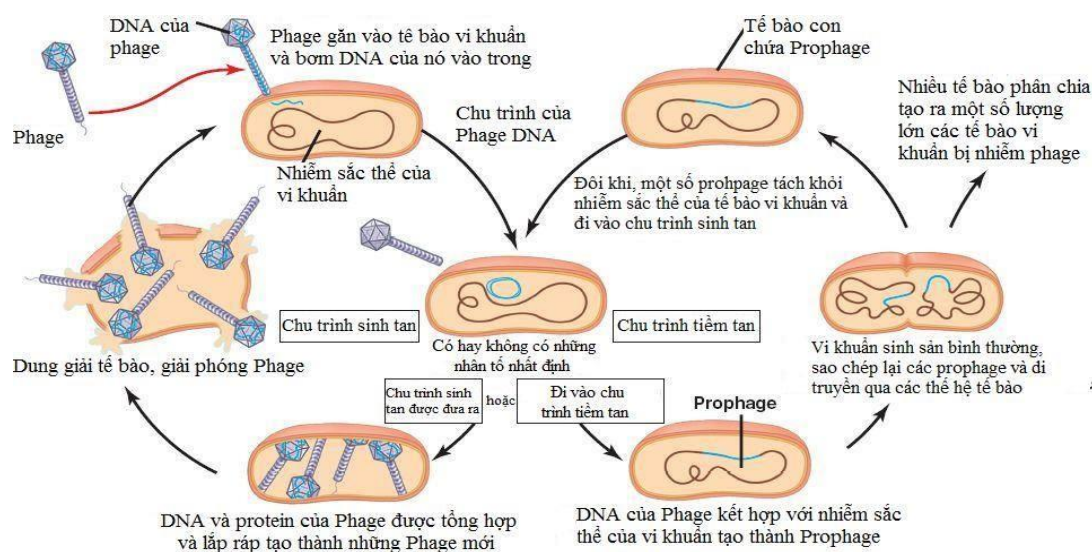
Bước đầu tiên của quá trình xâm nhiễm là sự hấp phụ của TKT lên bề mặt tế bào vi khuẩn bởi cấu trúc đuôi của TKT với một thụ thể cụ thể trên bề mặt tế bào, sau đó tiêm vật liệu di truyền từ đuôi vào tế bào chất của vật chủ [24]. Sau đó, về cơ bản, các quá trình tiếp đó đi theo chủ yếu một trong hai con đường:

- Đối với TKT độc lực: bộ gen của chúng ngay lập tức điều chỉnh phần lớn các quá trình trao đổi chất của tế bào vật chủ, vật liệu di truyền của virus được nhân lên, các vật liệu sẵn có trong tế bào được sử dụng để sinh tổng hợp những thành phần cần thiết cho việc hình thành TKT mới. Sau khi các thành phần được tổng hợp, TKT được lắp ráp trong tế bào thành TKT trưởng thành, màng tế bào bị ly giải và giải phóng hàng trăm TKT thế hệ con sẵn sàng xâm nhiễm các tế bào vật chủ khác.

- Đối với TKT ôn hòa: vật liệu di truyền của virus thường được tích hợp vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn được gọi là prophage. Tế bào vi khuẩn mang prophage còn được gọi là tế bào tiềm tan (lysogen), vật liệu di truyền của TKT được sao chép sang các tế bào con trong nhiều thế hệ [34]. Điều này có thể dẫn đến thay đổi kiểu hình của vật chủ và trong một số trường hợp làm tăng khả năng gây bệnh của vi khuẩn nếu bộ gen của chúng mang gen mã hóa độc tố hoặc các yếu tố độc lực khác [35]. Khi có các tác nhân gây đột biến làm tổn thương DNA (như tia cực tím, sốc nhiệt,..) tác động, prophage có thể lập tức bị kích hoạt chuyển sang dạng gây độc và bắt đầu quá trình sinh tan [29].

- Ngoài ra, các chu kỳ xâm nhiễm khác cũng được báo cáo. Chu kỳ giả tiềm tan (pseudo lysogenic) là giai đoạn mà phát triển đỉnh trệ của TKT trong tế bào chủ, không có sự nhân lên của vật liệu di truyền (như trong quá trình sinh tan) hay sao chép đồng thời với bộ gen của tế bào (như trong quá trình tiềm tan), nucleic acid của virus sẽ trong trạng thái không hoạt động. Hiện

tượng này xảy ra thường do các điều kiện không thuận lợi cho tế bào vật chủ (vd: môi trường nghèo dinh dưỡng). Trong trạng thái giả tiềm tan, quá trình xâm nhiễm bị ngưng lại, cho phép vi khuẩn có nhiều thời gian hơn để có thể chuyển sang môi trường thuận lợi để TKT có thể phát triển và nhân lên [36]. Một loại chu trình khác cũng đã được mô tả ở một số TKT dạng sợi (vd: TKT M13), đó là sự xâm nhiễm kéo dài, TKT được phát triển và liên tục được giải phóng thông qua sự bài tiết mà không làm mất khả năng sống của tế bào vật chủ.



Hình 1. 4. Chu kỳ sinh tan và tiềm tan của thực khuẩn thể

(Nguồn: Cambell, 2020)

1.2.4. Một số nghiên cứu và ứng dụng

Trong những năm qua, TKT đã được ứng dụng ở các mục đích khác nhau trong nhiều lĩnh vực bao gồm điều trị và phòng ngừa các bệnh truyền nhiễm ở người và động vật, cây trồng và kiểm soát sinh học mầm bệnh từ thực phẩm [37].

1.2.4.1. Ứng dụng trị bệnh ở người

Việc sử dụng kháng sinh bừa bãi và không đúng cách đã làm gia tăng số lượng vi khuẩn kháng thuốc, điều này trở thành mối đe dọa nghiêm trọng đối với việc điều trị bệnh truyền nhiễm trên toàn thế giới [38]. Một số vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, ... đã được xác định là kháng thuốc [39]. Việc điều trị thông thường bằng kháng sinh thường không đáp ứng đối

với sự nhiễm trùng bởi các loại vi khuẩn này [40]. Các vấn đề khó khăn liên quan đến phát triển thuốc kháng sinh mới đã hướng sự quan tâm đến liệu pháp thực khuẩn thể trong điều trị bệnh trên người [38].

Tuy nhiên việc áp dụng liệu pháp thực khuẩn thể trong điều trị và phòng ngừa các bệnh nhiễm trùng ở người vẫn gặp phải nhiều thách thức như việc hạn chế quy định, thách thức về vấn đề sản xuất, tính đặc hiệu,... [41]

1.2.4.2. Ứng dụng trong chăn nuôi và trồng trọt

Bên cạnh các ứng dụng của thực khuẩn thể trong điều trị bệnh ở người, các tác nhân này cũng được sử dụng để điều trị và kiểm soát các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn ở động vật nuôi và cây trồng [42]. Động vật nuôi và cây trồng sử dụng trong sản xuất thực phẩm là một trong những nguồn lây nhiễm vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm [42].

Các vi khuẩn như *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Salmonella* spp. và *Listeria* spp. là tác nhân gây bệnh chủ yếu từ thực phẩm có nguồn gốc động vật và có thể hiện diện trong đường tiêu hóa của gia súc nhai lại, gia cầm và lợn mà không có triệu chứng [43]. Do sự gia tăng tính kháng kháng sinh của một số vi khuẩn này nhiều nước trong liên minh châu Âu đã cấm sử dụng kháng sinh thường xuyên trong chăn nuôi [44]. Các biện pháp can thiệp khác, chẳng hạn như liệu pháp thực khuẩn thể đã nổi lên như một giải pháp thay thế để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trên động vật và cây trồng [45]. Liệu pháp này có thể ngăn ngừa bệnh tật và giảm số lượng vi khuẩn gây hại trong đường tiêu hóa, cũng như giảm thiểu sự xâm nhập của chúng vào chuỗi thức ăn và làm giảm nguy cơ gây bệnh cho người tiêu dùng [46] (Bảng 1.3)

Bảng 1. 3. Một số nghiên cứu ứng dụng TKT trên động vật nuôi và cây trồng

Đối tượng	Vi khuẩn chủ	Kết quả nghiên cứu	TLTK
Khoai tây	<i>Dickeya solani</i>	Giảm tỷ lệ mắc bệnh và mức độ nghiêm trọng trong các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm. Đối với thử nghiệm trên thực địa, khoai tây được xử lý TKT cho năng suất cao hơn.	[47]
Cừu	<i>E. coli O157: H7</i>	Phage cocktail làm giảm >99,9% số lượng vi khuẩn	[48]
Lợn	<i>Salmonella</i> spp.	Giảm <i>Salmonella</i> spp. 90 – 99,9% trong amidan, hồi tràng và manh tràng lợn	[49]
Bò sữa	<i>Staphylococcus aureus</i>	Không phát hiện sự gia tăng tế bào trong sữa khi điều trị bằng TKT	[50]
Tôm sú	<i>Vibrio harveyi</i>	Tỷ lệ sống sót của tôm sú đạt 85% khi sử dụng phage, cao hơn so với khi sử dụng kháng sinh	[51]
Cá trê	<i>Flavobacterium columnare</i>	Sau khi được xử lý bằng phage, cá không có triệu chứng bệnh và tỷ lệ sống đạt 100% sau khi cho nhiễm với <i>Flavobacterium columnare</i>	[52]
Cà chua	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Xử lý bằng TKT làm giảm sự phát triển của vi khuẩn nhưng không ức chế hoàn toàn	[53]

1.2.4.3. Ứng dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm

Một trong những lĩnh vực hứa hẹn nhất để ứng dụng TKT là kiểm soát vi khuẩn gây bệnh và hư hỏng thực phẩm. Sự hiện diện của vi sinh vật có thể ảnh hưởng đến sự an toàn của thực phẩm và gây ra các vấn đề sức khỏe cộng đồng nghiêm trọng cũng như gây thiệt hại kinh tế. Hàng năm, hàng triệu trường hợp bệnh do thực phẩm đã được báo cáo trên toàn thế giới, nguyên nhân là do điều kiện vệ sinh kém trong chuỗi sản xuất [54]. Các vi khuẩn chính liên quan đến bùng phát dịch bệnh từ thực phẩm là *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. và các chủng *E. coli* gây bệnh [55]. Các công nghệ khác nhau có thể được sử dụng để giảm hoặc loại bỏ các mầm bệnh và sự hư hỏng của thực

phẩm nhằm đảm bảo an toàn cho người tiêu dùng và kéo dài thời hạn sử dụng của sản phẩm. Tuy nhiên, nhiều công nghệ có thể thay đổi chất lượng cảm quan của thực phẩm và không đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng về thực phẩm ít chất bảo quản. Do đó, việc tìm kiếm các công nghệ mới để giải quyết các vấn đề lây nhiễm vi sinh trong thực phẩm ngày càng tăng. Một số nghiên cứu về việc sử dụng TKT để kiểm soát vi khuẩn trong thực phẩm được trình bày trong Bảng 1.4.

Bảng 1. 4. Một số nghiên cứu về việc sử dụng TKT để kiểm soát vi khuẩn trong thực phẩm

Thực phẩm	Vi khuẩn gây bệnh	Kết quả chính	TLTK
Rau diếp và thịt bò	<i>E. coli</i> EHEC O157: H7	Sản phẩm thương mại EcoShield™ làm giảm vi khuẩn gây bệnh trong thịt bò > 94%, rau diếp 87% trong vòng 5 phút	[56]
Sữa bột	<i>Enterobacter sakazakii</i>	Phage có nồng độ 10 ⁹ PFU/ml có hiệu quả cao trong việc tiêu diệt vi khuẩn	[57]
Phô mai mềm	<i>Listeria monocytogenes</i>	Xử lý bằng phage làm giảm 3,5 log CFU/g <i>L. monocytogenes</i> ở 4°C	[58]
Táo và dưa lưới	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cả hai loại quả đều giảm số lượng vi khuẩn gây bệnh sau khi xử lý bằng TKT. Tuy nhiên, số lượng TKT giảm nhanh do pH acid	[59]
Sữa	<i>Staphylococcus aureus</i>	TKT làm giảm số lượng <i>S. aureus</i> trong quá trình làm sữa đông	[60]

Các đặc điểm như tính đặc hiệu, khả năng tự nhân lên, giữ các đặc tính cảm quan của thực phẩm, và an toàn với môi trường làm cho công nghệ này trở nên hấp dẫn để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm. Tuy nhiên, một số khía cạnh cần được quan tâm trong việc lựa chọn các TKT dùng cho các phương pháp xử lý thức ăn như phạm vi vật chủ, trình tự bộ gen và chu kỳ lây nhiễm. Hơn nữa, cần đánh giá các tác động gây ra bởi các đặc tính của thực phẩm và các bước chế biến, chẳng hạn như độ pH, nhiệt độ và điều kiện bảo quản. Phần lớn các nghiên cứu kiểm tra khả năng ly giải của TKT ở nhiệt độ phát triển tối ưu đối với mầm bệnh. Các quy định đối với việc áp dụng

TKT trong xử lý sinh học các sản phẩm thực phẩm là rất chặt chẽ và có thể ngăn cản việc đưa chúng vào một số thị trường nhất định. Tuy nhiên, có một số sản phẩm đã được phê duyệt có sẵn trên thị trường để kiểm soát sinh học vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm. Một trong những sản phẩm này được đặt tên là ‘Listex’ và được tạo bởi huyền phù TKT chống lại *L. monocytogenes*. Những kết quả này mở ra triển vọng của việc áp dụng liệu pháp thực khuẩn thể trong chế biến và bảo quản thực phẩm.

Tại Việt Nam hiện vẫn chưa có báo cáo nào về việc áp dụng thực khuẩn thể trong việc kiểm soát vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm *B. cereus* dù loài vi khuẩn này là một trong những tác nhân gây ngộ độc hàng đầu. Do đó, việc nghiên cứu về thực khuẩn thể đặc hiệu *B. cereus* là rất cần thiết nhằm phát triển và ứng dụng chế phẩm TKT trong kiểm soát sự lây nhiễm *B. cereus* của góp phần vào việc nâng cao chất lượng sản phẩm và kiểm soát an toàn thực phẩm ở nước ta.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Vi khuẩn vật chủ

4 chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* (VTCC 11273, VTCC 10949, VTCC 11289, VTCC 11265) được cung cấp bởi Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia – Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Cầu Giấy, Hà Nội. Nguồn gốc phân lập vi khuẩn từ đất và rong sụn.

- Nguồn mẫu

39 mẫu nước thải sinh hoạt và 15 mẫu đất được thu thập ở nhiều địa điểm khác nhau tại quận Cầu giấy, Hà Nội, Việt Nam vào tháng 02/2022. Các mẫu được đựng trong túi vô trùng và bảo quản ở 4°C.

2.1.1. Hóa chất

- Hóa chất: Cao nấm men, cao thịt, tryptone (Himedia-Ấn Độ) ; NaCl (Trung Quốc), MgSO₄, Tris-HCl, manitol, phenol đỏ, agar bacteri

- Môi trường :

Môi trường 1 : Môi trường LBA (Luria-Bertani) (g/L)

Cao nấm men 10g; Tryptone 5g; NaCl 10g; agar 20g; nước 1000mL; pH = 6,2 – 7,0

Môi trường 2: Môi trường chọn lọc *B. cereus* MYP (Manitol – egg Yolk – Polymicine agar)

Manitol 10g; Peptone 10g; Phenol đỏ 0,0025g; lòng đỏ trứng gà 10mL; NaCl 10g; cao thịt 1g Agar 20g; nước 1000mL; pH = 7,2 ± 0,2

- Các loại dung dịch

Dung dịch HCl 6M và dung dịch NaOH 5M để điều chỉnh pH

Dung dịch muối NaCl 5M: 29,22g NaCl, 100mL nước

Dung dịch muối MgSO₄ 1M: 12,3g MgSO₄, 50mL nước

Dung dịch đệm Tris-HCl 1M, pH 7,5: 7,882g Tris-HCl, 90mL nước, điều chỉnh pH bằng dung dịch NaOH.

Dung dịch đệm SM (Sodium chloride, Magnesium sulphate) (mL/L)

5M NaCl 20mL; 1M Tris-HCl 10mL; 1M MgSO₄ 50mL; H₂O 920mL

2.1.2. Trang thiết bị

- Lò vi sóng

- Tủ nuôi vi sinh vật
- Máy khuấy từ (RotoLab, OSI)
- Máy ly tâm (Microcentrifuge – Sorvall, Mỹ)
- Tủ lạnh 4°C
- Tủ lạnh sâu -20°C; -80°C (Sanyo, Nhật Bản)
- Máy khuấy trộn Vortex (RotoLab, OSI)
- Máy quang phổ (Shimadzu, Nhật Bản)
- Cân phân tích 10⁻⁴g (Mettler Toledo)
- Cân điện 10⁻²g (Mettler Toledo)
- Tủ cấy vô trùng (Sanyo)
- Pipet các loại (Pipettman)
- Nồi khử trùng (Nhật Bản)
- Máy ly tâm lạnh (Sorvall Biofuge Fresco)

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp phân lập thực khuẩn thể

Xử lý mẫu:

- Mẫu nước thải được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ cặn bẩn.
- Mẫu đất được nhặt bỏ sỏi đá, lá rụng.

Làm giàu:

Các mẫu sử dụng để phân lập TKT được làm giàu bằng phương pháp mô tả bởi Twest và Kropinski (2009) có chỉnh sửa [61]:

- 10ml mẫu nước thải được cho vào ống falcon cùng với 10ml môi trường LB và 100µl mỗi dịch vi khuẩn chỉ thị đã nuôi qua đêm.
- Tương tự, 10g mẫu đất được bổ sung 100ml môi trường LB cùng 100µl mỗi dịch vi khuẩn chỉ thị. Các mẫu sau đó được nuôi lắc qua đêm ở 37°C, 150 vòng/phút.

Phân lập TKT bằng phương pháp nhỏ giọt trên bề mặt thạch 2 lớp với một vài chỉnh sửa [62]:

- Ly tâm hỗn hợp dịch nuôi vi khuẩn + phage qua đêm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ cặn, phần dịch nổi thu được lọc qua

màng lọc 0,22 μ m để loại vi khuẩn còn sót lại. Dịch thu được gọi là dịch phage.

- Nhỏ 10 μ l dịch phage thu được lên đĩa thạch 2 lớp đã được bổ sung 100 μ l vi khuẩn chỉ thị. Để khô ở nhiệt độ phòng
- Lật ngược đĩa và nuôi 37°C trong 24 giờ và quan sát sự hình thành vùng ly giải trên lớp vi khuẩn.
- Mỗi vùng tan quan sát được trong thí nghiệm thạch 2 lớp được lấy ra bằng đầu tip pipette vô trùng cho vào 10ml môi trường LB cùng với 100 μ l dịch mỗi loại vi khuẩn chỉ thị, nuôi lắc qua đêm ở 37°C.
- Hỗn hợp được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi, dịch nổi được lọc qua màng 0,22 μ m để loại vi khuẩn.
- Dịch TKT sau đó được pha loãng ra các dải nồng độ, 100 μ l dịch mỗi nồng độ pha loãng trộn cùng 100 μ l vi khuẩn chỉ thị (OD = 0,7) được dùng để đổ đĩa thạch 2 lớp. Các đĩa được nuôi qua đêm 37°C, quan sát hình thái và số lượng vết tan để xác định mật độ phage.

Tinh sạch TKT

- Một vết tan riêng rẽ quan sát được cẩn thận lấy ra và hòa vào 1ml đệm SM, vortex nhẹ để TKT hòa vào đệm.
- Ly tâm hỗn hợp 6000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch nổi và lọc qua màng 0,22 μ m.
- 100 μ l dịch lọc TKT được trộn vào 3ml môi trường LB 0,7% agar (55-60°C) cùng với 100 μ l dịch vi khuẩn thử nghiệm, sau đó được đổ đều lên mặt thạch LB 2%. Quan sát hình thái vết tan hình thành sau khi nuôi ở 37°C trong 24 giờ.

Lặp lại bước này 3 – 5 lần đến khi quan sát thấy sự đồng đều về kích thước vết tan.

- Dịch TKT sau đó được pha loãng ra các dải nồng độ, 100 μ l dịch mỗi nồng độ pha loãng trộn cùng 100 μ l vi khuẩn chỉ thị (OD = 0,7) được dùng để đổ đĩa thạch 2 lớp. Các đĩa được nuôi qua đêm 37°C, quan sát hình thái và số lượng vết tan để xác định mật độ phage.

2.2.2. Khảo sát phổ vật chủ của thực khuẩn thể

Phổ vật chủ của thực khuẩn thể được khảo sát dựa vào phương pháp nhỏ giọt trên bề mặt thạch hai lớp [63].

- Chuẩn bị đĩa thạch 2 lớp: bổ sung 100 μ l dịch vi khuẩn chỉ thị (10^8 CFU/ml) vào 3ml thạch agar 0,7%, trộn đều và đổ hỗn hợp lên đĩa petri đã chuẩn bị sẵn 1 lớp môi trường LB 2% agar.
- Nhỏ 10 μ l dịch TKT đã tinh sạch, 10 μ l dịch môi trường LB và đệm SM (đối chứng âm) lên đĩa thạch.
- Đĩa thạch được để khô ở nhiệt độ phòng trước khi nuôi ủ ở 37°C trong 24 giờ. Quan sát các vùng vi khuẩn bị ly giải.
- Thực thí nghiệm với từng chủng vi khuẩn *B. cereus* khác nhau. Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp lại

2.2.3. Xác định tỷ lệ lây nhiễm của thực khuẩn thể

Tỷ lệ lây nhiễm (MOI) được định nghĩa là tỷ lệ giữa các tác nhân lây nhiễm (ví dụ như virus...) với vật chủ mục tiêu (ví dụ: tế bào...) [64]. Thí nghiệm xác định tỷ lệ lây nhiễm được dựa trên phương pháp đề xuất bởi Lu và cộng sự (2003) với một vài sửa đổi [65].

- Vi khuẩn *B. cereus* (khoảng 10^8 CFU/ml) được lây nhiễm với TKT tuyển chọn ở các tỷ lệ 0,01; 0,1; 1 và 10 PFU/CFU.
- Hỗn hợp được nuôi lắc trong 3,5 giờ ở 37°C. Sau đó, ly tâm hỗn hợp ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi thu được được lọc qua màng lọc 0,22 μ m.
- Dịch trong thu được được xác định mật độ TKT bằng phương pháp thạch hai lớp. Quan sát và đếm số lượng vết tan
- Kết quả tại tỷ lệ MOI nào có mật độ TKT cao nhất trong vòng 3,5 giờ được coi là MOI tối ưu và được sử dụng trong thí nghiệm tiếp theo.

2.2.4. Xây dựng đường cong sinh trưởng của thực khuẩn thể

Đường cong sinh trưởng của thực khuẩn thể được xác định dựa trên phương pháp đã được mô tả bởi Hong và cộng sự (2014) như sau [66]: Trộn đều TKT với 500 μ L dịch vi khuẩn (10^8 CFU/mL) với tỉ lệ MOI thích hợp. Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 10 phút để TKT được hấp phụ, sau đó ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 30 giây ở nhiệt độ phòng. Phần cặn có chứa vi khuẩn hấp phụ

TKT được hòa lại trong 10ml môi trường LB. Lấy 100 μ l mẫu mỗi 5 phút trong 1,5 giờ để xác định mật độ TKT và vi khuẩn. Thực khuẩn thể trong mỗi mẫu được xác định bằng phương pháp đếm vết tan, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thời kì tiềm tàng được xác định trực tiếp trên đường cong sinh trưởng và hệ số nhân virus được tính theo công thức sau [67]:

$$\text{Hệ số nhân virus} = \frac{\text{Số TKT trung bình ở pha cân bằng}}{\text{Số tế bào bị xâm nhiễm}}$$

Trong đó, số tế bào bị xâm nhiễm được xác định bằng cách trừ số lượng tế bào ban đầu cho số tế bào không bị xâm nhiễm.

2.2.5. Phân loại chủng thực khuẩn thể được tuyển chọn

Hình thái thực khuẩn thể được quan sát và phân tích bằng phương pháp soi kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) [68]

Chuẩn bị mẫu soi kính

Dịch thực khuẩn thể tinh sạch (10^8 PFU/mL) được nhỏ lên mạng lưới đồng phủ carbon và được nhuộm âm bản bằng dung dịch 2% uranyl acetate (pH 4.0) trong 20 giây. Hình thái TKT được quan sát và chụp lại bằng kính hiển vi điện tử EM 1010- Jeol với hiệu điện thế 100kV tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Thực khuẩn thể được phân loại dựa các nguyên tắc phân loại của Ủy ban quốc tế về phân loại virus (International Committee on Taxonomy of Viruses).

2.2.6. Nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến sự ổn định của TKT

Điều kiện nhiệt độ [69]

Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng đối với khả năng sống sót của thể thực khuẩn [70–72]. Để xác định sự ảnh hưởng của nhiệt độ đối với TKT, dung dịch TKT đã biết trước mật độ (khoảng 10^8 PFU/ml) được ủ trong vòng 1 giờ ở các điều kiện nhiệt độ 20 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C, 70 °C và tại các nhiệt độ -80°C, -20°C, 4°C sau 3, 7, 10 ngày. Mật độ TKT được xác định bằng phương pháp thạch 2 lớp.

Điều kiện pH

Thử nghiệm độ pH ảnh hưởng đến hoạt tính của TKT được thực hiện dựa trên phương pháp được mô tả bởi Li và cộng sự (2020) có sự sửa đổi [69]: Dịch TKT tinh sạch với nồng độ biết trước (10^8 PFU/ml) được hòa vào đệm SM với pH 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12 (v/v = 1:1) và để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Mật độ TKT được xác định bằng phương pháp thạch 2 lớp.

Điều kiện độ mặn [69]

Khảo sát sự ổn định của TKT trong NaCl bằng cách hòa TKT trong dung dịch NaCl với nồng độ khác nhau (50, 100, 200, 300, 400, 500 và 1000 mM) và để trong 1 giờ. Mật độ TKT ở các nồng độ muối khác nhau được xác định bằng phương pháp đếm vết tan.

Điều kiện tia UV

Phương pháp khảo sát sự ảnh hưởng của UV đối với TKT dựa trên phương pháp của Sui và cộng sự (2021) với một vài chỉnh sửa [73]. TKT (mật độ 10^8 PFU/ml) được phơi nhiễm tia cực tím (bước sóng 254nm), khoảng cách từ mẫu kiểm tra đến nguồn tia là 0,6m trong tủ cấy vi sinh. Rút 100 μ l mỗi 10 phút trong 1 giờ để xác định mật độ bằng phương pháp thạch hai lớp.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

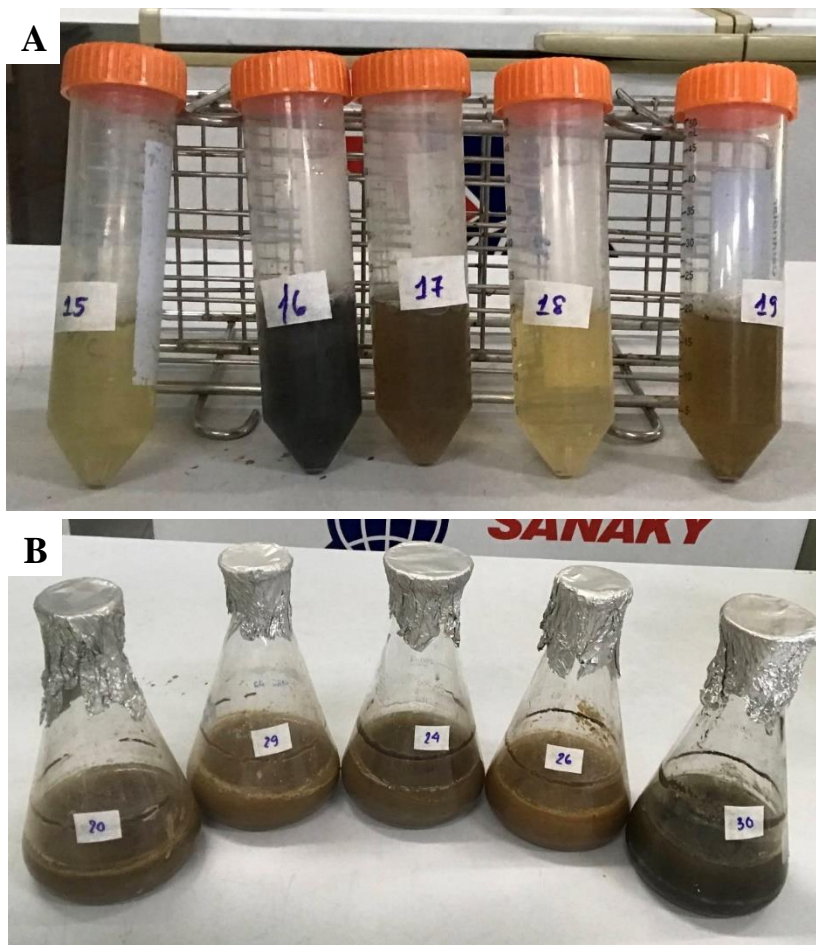
Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện 3 lần, kết quả được biểu diễn ở dạng giá trị trung bình (Mean) \pm sai số (SD). Sự khác biệt về mật độ phage giữa các nhóm thí nghiệm được đánh giá bằng ANOVA-one way và Post – hoc test sử dụng phần mềm SPSS (Tập đoàn IBM, Armonk, New York, Hoa Kỳ). Mức sai khác ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

Đồ thị được vẽ sử dụng Excel.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập TKT

Với 54 mẫu nghiên cứu (39 mẫu nước thải sinh hoạt và 15 mẫu đất được thu thập ở nhiều địa điểm khác nhau tại quận Cầu giấy, Hà Nội) (Hình 3.1), sử dụng 4 chủng vi khuẩn chỉ thị để phân lập thực khuẩn thể bằng phương pháp nhỏ giọt trên thạch hai lớp, chúng tôi đã ghi nhận được 17 mẫu có sự xuất hiện của thực khuẩn thể với vết tan trong ở vị trí nhỏ giọt, trong đó 2 chủng thực khuẩn thể (16, 17) từ nguồn nước thải tại khu vực dân cư sinh hoạt và 15 chủng thực khuẩn thể (20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35) từ đất ở địa bàn quận Cầu Giấy, Hà Nội. Tất cả các dòng thực khuẩn thể phân lập được tinh sạch ít nhất 3 lần cho đến khi quan sát thấy các vết tan rõ ràng và có kích thước đồng đều (Hình 3.2B) và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Các dòng TKT có sự đa dạng về kích thước vết tan từ 1 – 3 mm.

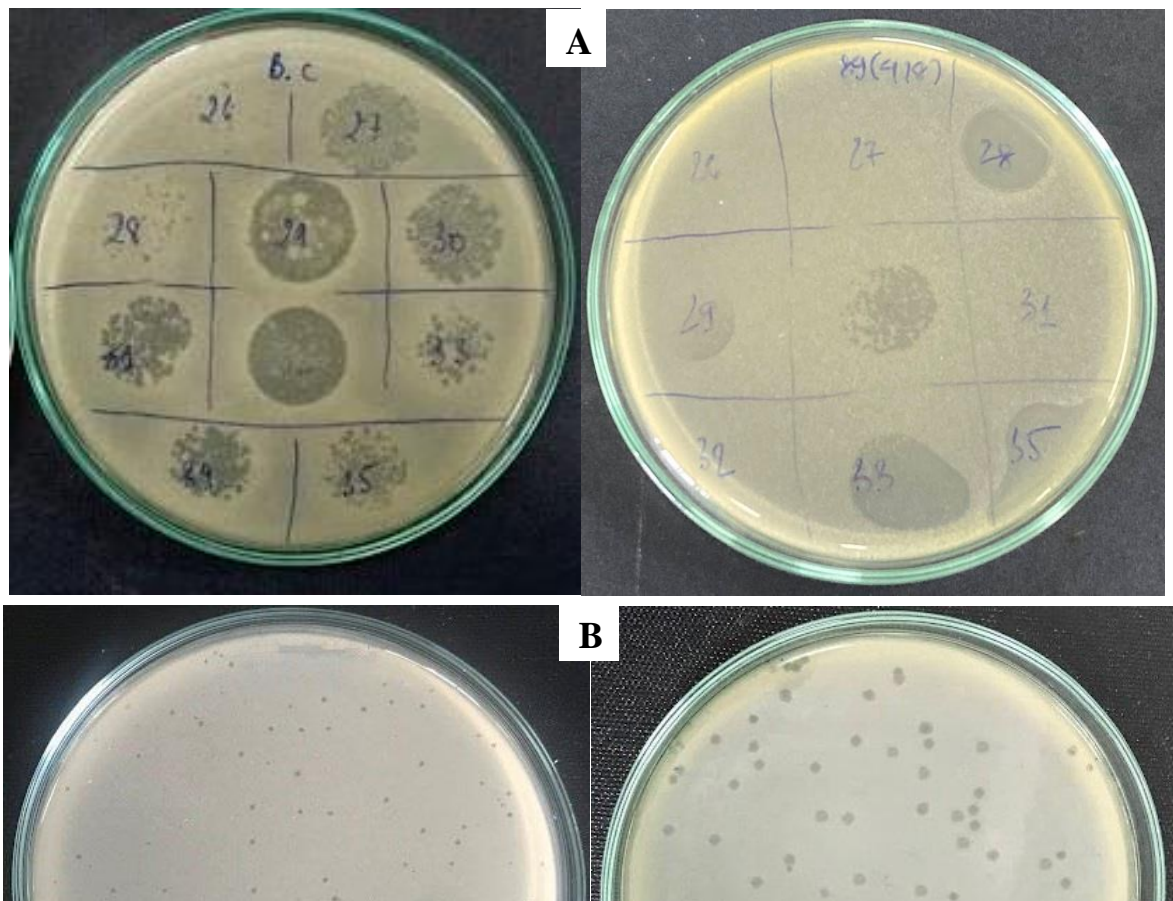


Hình 3. 1. Hình ảnh mẫu nghiên cứu được sử dụng để phân lập TKT (A) Mẫu nước thải (B) Mẫu đất được bổ sung môi trường làm giàu

Tỉ lệ có mặt của TKT chiếm 31,48% (17 mẫu trên 54 mẫu nghiên cứu). Trong đó, tỉ lệ TKT được phân lập từ đất là 100% (15/15) cao hơn rất nhiều so với phân lập từ mẫu nước thải sinh hoạt chỉ có 5,13% (2/39). (Bảng 3.1).

Bảng 3. 1. Tỉ lệ phân lập TKT từ mẫu nghiên cứu

Đặc điểm mẫu	Số lượng mẫu	Số lượng mẫu có TKT	Tỉ lệ
Nước thải	39	2	5,13%
Đất	15	15	100%
Tổng	54	17	31,48%



Hình 3. 2. Một số kết quả phân lập TKT

(A) Kết quả khảo sát sự có mặt của TKT bằng phương pháp nhỏ giọt với VTCC 11273 (trái), VTCC 11289 (phải) làm vi khuẩn chủ

(B) Kết quả tinh sạch dòng TKT 24 (trái), TKT 16 (phải) với chủng VTCC 11273 là vi khuẩn kí chủ

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với kết quả trong các nghiên cứu của các tác giả trước. Guinebretiere và cộng sự (2003) đã ước tính có đến $10^3 - 10^5$ bào tử vi khuẩn *B. cereus* có trong 1 gram đất khô [74]. Theo Radosevich và cộng sự (2005), TKT có thể tìm thấy ở bất kỳ môi trường nào có chứa kí chủ thích hợp và TKT là những sinh vật rất phổ biến trong đất [75]. Kết quả thu được cũng tương đồng với nghiên cứu trước đó của Oh và cộng sự (2017), các tác giả phân lập thực khuẩn thể từ toàn bộ 11 mẫu đất thu thập được với tỷ lệ phân lập lên đến 100%; đường kính vết tan từ 1 – 4 mm [76]. Lee và cộng sự (2011) phân lập được từ đất hai thực khuẩn thể có hình dạng vết tan khác nhau, sử dụng chủng vi khuẩn *B. cereus* phân lập từ khoai tây nghiền; đường kính hai thực khuẩn thể đều khá nhỏ chỉ khoảng 1mm [77]. Hai thực khuẩn thể ly giải *B.ceresus* (S1-BC và S2-BC) được Roseline và cộng sự (2021) phân lập từ đất mùn đen và đất đá ong [78]. Thorne (1968) đã phân lập được thể thực khuẩn CP – 51 từ đất nhiễm vi khuẩn *B.cereus* NRRL 569 và là thực khuẩn thể được tham chiếu rộng rãi nhất trong nhóm thực khuẩn thể ly giải *B.cereus* tính cho đến nay [79]. Không chỉ phổ biến ở trong đất, nước thải cũng là nơi tìm thấy thực khuẩn thể như công bố của Weinbauer (2004) [80]. Thật vậy, cho tới nay đã có một vài báo cáo về TKT phân lập từ nước thải như Rovik và cộng sự (2017) đã công bố 9 TKT xâm nhiễm *B.cereus* được phân lập từ nước thải tại một loạt các bệnh viện tại Indonesia [81]; Gdoura-Ben Amor và cộng sự (2022) đã phân lập được TKT ly giải *Bacillus cereus* từ các mẫu nước thải trước và sau khi xử lý tại một nhà máy xử lý nước thải tại Pháp [82].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng một phương pháp làm giàu bằng cách sử dụng hỗn hợp toàn bộ chủng *B. cereus* để nhân nuôi các TKT hiện diện trong trong mẫu, như vậy, dù TKT có trong mẫu với số lượng nhỏ cũng sẽ được nhân lên. Phương pháp này giúp tăng cường xác suất phân lập được thể thực khuẩn một cách nhanh chóng và hiệu quả. Phương pháp này khác biệt với phương pháp làm giàu truyền thống khác khi chỉ bổ sung môi trường để tăng sinh hệ vi sinh vật có sẵn trong mẫu vật bao gồm cả vi khuẩn *B.cereus*, tuy nhiên, các loại vi sinh vật khác không phải *B.cereus* cũng sẽ được nhân lên cạnh tranh với vi khuẩn đích, điều này có thể làm giảm hiệu quả phân lập TKT mong muốn. Nghiên cứu của chúng tôi dựa trên các nghiên

cứu của các tác giả trước, các tác giả sử dụng hàng loạt các chủng vi khuẩn để phân lập nhiều loại TKT lây nhiễm vi khuẩn gây bệnh *Campylobacter jejuni* và *Vibrio harveyi* [83,84].

3.2. Kết quả xác định phổ vật chủ của TKT

Bốn chủng vi khuẩn *B. cereus* (VTCC 11273, VTCC 11289, VTCC 11265 và VTCC 10949) được sử dụng làm vi khuẩn chỉ thị để xác định phổ vật chủ, lựa chọn chủng thực khuẩn thể có khả năng tiêu diệt nhiều chủng vi khuẩn.

Các kết quả được biểu diễn ở Bảng 3.2 cho thấy TKT 24 có khả năng tiêu diệt cả 4 chủng vi khuẩn thử nghiệm với vết tan rõ ràng, kết quả này cho thấy TKT 24 là TKT độc lực mạnh nhất, có phổ hoạt vật chủ rộng và là chủng tiềm năng để phát triển chế phẩm TKT; tiếp đến là các dòng kí hiệu (22, 23, 30, 33, 35) ly giải được 3 chủng trên tổng số 4 chủng vi khuẩn chỉ thị; các dòng (20, 21, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 34) có khả năng ly giải 2 chủng vi khuẩn chỉ thị, các dòng TKT này xâm nhiễm các chủng vi khuẩn với mức độ mạnh yếu khác nhau thể hiện qua vết tan rõ hay mờ. Cuối cùng 2 dòng TKT 16, 17 được phân lập từ nước thải sinh hoạt chỉ ly giải được 1 chủng vi khuẩn trên tổng 4 chủng vi khuẩn chỉ thị được thử nghiệm, vết tan hình thành từ 2 dòng TKT rõ và trong, phổ vật chủ hẹp của 2 dòng TKT này thể hiện sự đặc hiệu đến cấp chủng của TKT (Hình 3.3ABCD).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước. Kong và cộng sự (2018) phân lập được chủng TKT được kí hiệu PBC2 từ nước cống tại Liên Bang Nga, chủng TKT này có đặc điểm ly giải rất đặc hiệu, chỉ ly giải được 1 chủng vi khuẩn trong số 9 chủng *B. cereus* được thử nghiệm [85]. Khác biệt với kết quả nghiên cứu của El – Arabi và cộng sự (2013), thực khuẩn thể Bc431v3 được phân lập từ một nhà máy xử lý nước thải tại Canada có khả năng ly giải toàn bộ 17 chủng vi khuẩn *B.cereus* thử nghiệm [86]. Hai chủng TKT ký hiệu FWLBc1 và FWLBc2 ly giải tương ứng 6 và 9 trên 12 chủng vi khuẩn thử nghiệm [77]. Trong một nghiên cứu khác, khi khảo sát phổ kí chủ của thể thực khuẩn ΦBC01 các tác giả cho thấy chúng có khả năng ly giải cả 5 chủng *B.cereus* chỉ thị [87]. Theo Kutateladze

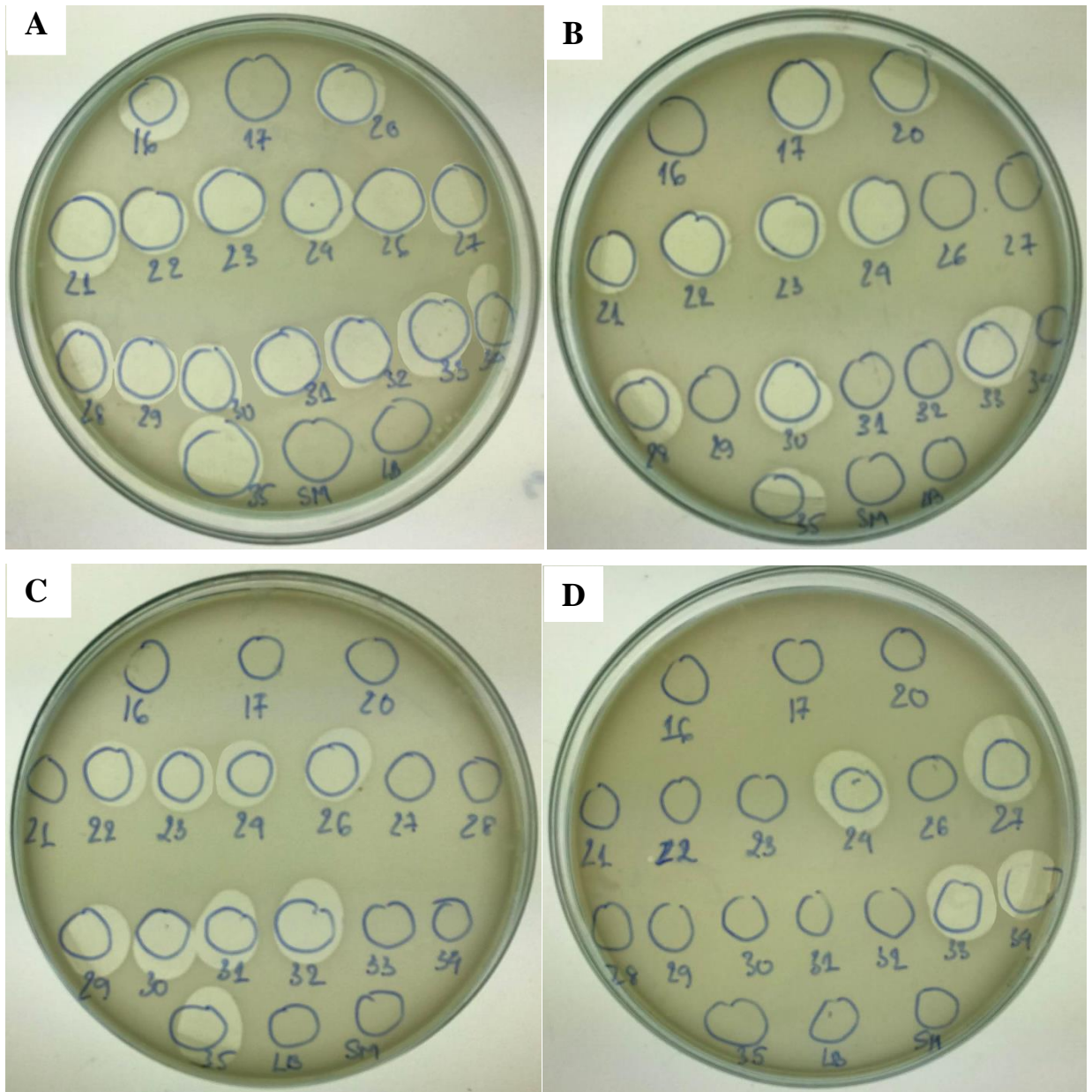
và Adamia (2010), TKT có tính đặc hiệu một loài vi khuẩn hoặc vài dòng trong cùng một loài [38].

Các TKT có phạm vi vật chủ rộng được coi là hữu ích hơn trong một số ứng dụng [88]. Đối với liệu pháp TKT, một TKT có phổ kí chủ rộng tiêu diệt nhiều chủng vi khuẩn tương đương với một loại kháng sinh phổ rộng. Hiện nay, nhiều dòng TKT được trộn thành cocktail để có thể diệt nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh [38]. Vì lý do trên, TKT kí hiệu 24 thể hiện khả năng ly giải mạnh nhất ở cả 4 chủng vi khuẩn kiểm định nên được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Với phổ ly giải nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh *B. cereus*, TKT 24 có thể là ứng cử viên tiềm năng trong việc tạo chế phẩm TKT ức chế *B. cereus* trong ngành công nghiệp thực phẩm.

Bảng 3. 1. Phổ vật chủ của 17 dòng TKT phân lập

Vi khuẩn Phage	VTCC 11273	VTCC 11289	VTCC 11265	VTCC 10949
16	+	-	-	-
17	-	+	-	-
20	+	+	-	-
21	+	+	-	-
22	+	+	+	-
23	+	+	+	-
24	+	+	+	+
26	+	-	+	-
27	+	-	-	+
28	+	+	-	-
29	+	-	+	-
30	+	+	+	-
31	+	-	+	-
32	+	-	+	-
33	+	+	-	+
34	+	-	-	+
35	+	+	+	-

Chú thích: (+): TKT xâm nhiễm vi khuẩn; (-): TKT không xâm nhiễm vi khuẩn



Hình 3. 3. Một số hình ảnh thí nghiệm khảo sát phổ vật chủ

(A): Kết quả thí nghiệm nhỏ giọt trên vi khuẩn VTCC 11273 với đối chứng âm là môi trường LB, đệm SM

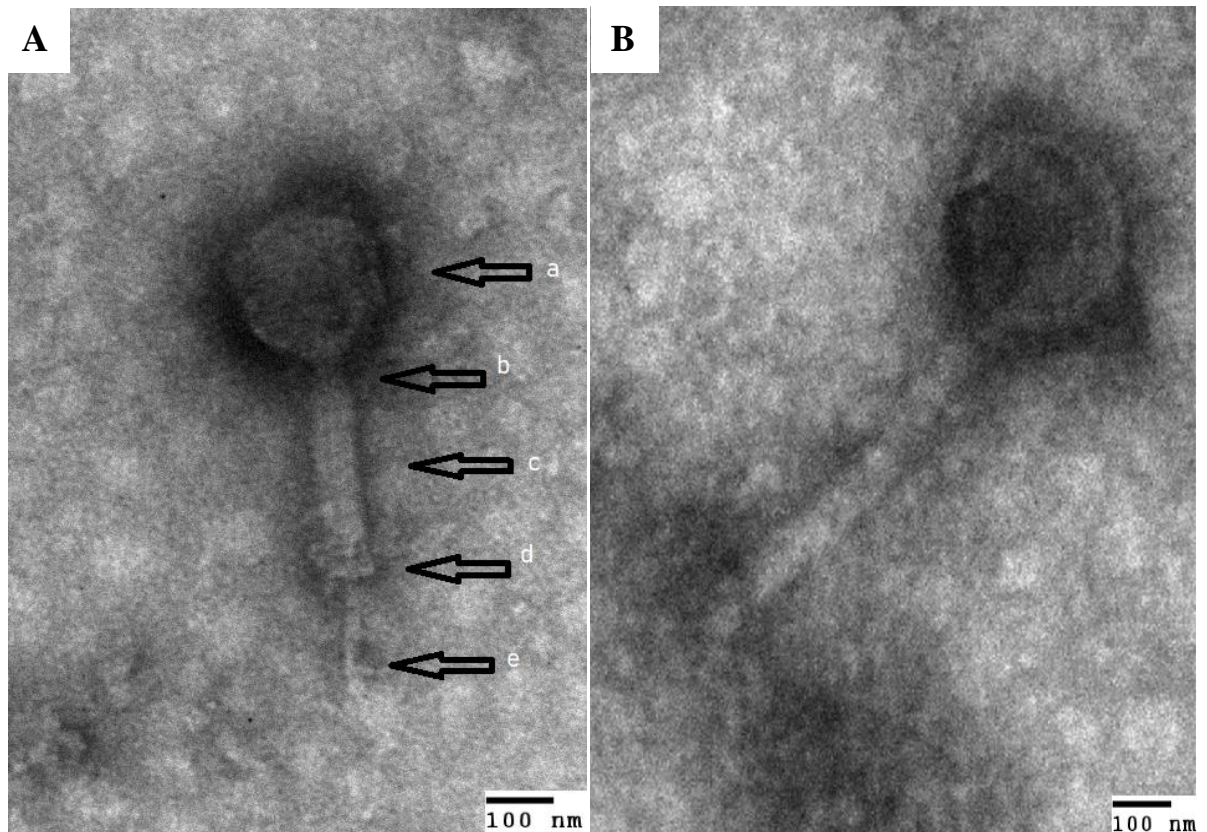
(B): Kết quả thí nghiệm nhỏ giọt trên vi khuẩn VTCC 11289 với đối chứng âm là môi trường LB, đệm SM

(C): Kết quả thí nghiệm nhỏ giọt trên vi khuẩn VTCC 11265 với đối chứng âm là môi trường LB, đệm SM

(D): Kết quả thí nghiệm nhỏ giọt trên vi khuẩn VTCC 10949 với đối chứng âm là môi trường LB, đệm SM

3.3. Kết quả quan sát hình thái TKT qua TEM

Hình thái thể thực khuẩn của TKT số 24 được xác định qua kính hiển vi điện tử truyền qua TEM. Dựa vào hình ảnh thu được (Hình 3.4), có thể thấy TKT 24 có cấu trúc đầu đuôi rõ ràng, do đó, chúng thuộc bộ *Caudovirales*. TKT có cấu trúc đầu thập nhị diện, kích thước $93,3 \pm 2,5$ nm; đuôi dài co duỗi được với kích thước 131 ± 3 nm khi co lại và khoảng 174 ± 4 nm khi duỗi. Từ những hình ảnh quan sát được, dựa theo Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (ICTV), TKT 24 được xác định thuộc họ *Myoviridae* [89].



Hình 3. 4. Hình thái TKT 24 được soi bằng TEM khung tỉ lệ 100 nm

(A) TKT 24 với đuôi đang co lại (a – đầu, b – cổ, c – vỏ đuôi, d – đĩa gốc (base plate), e - ống đuôi (tail tube))

(B) Hình ảnh TKT 24 ở trạng thái đuôi duỗi

Kích thước đầu của TKT 24 lớn hơn so với TKT CP – 51 (90nm); BPS10C, BPS13 (79,9nm) và vB_BceM_Bc431v3 (85,4 nm) nhưng nhỏ hơn so với FWLBc1 (97 ± 5 nm); FWLBc2 (96 ± 6 nm); JBP901 (95 ± 5 nm) [79,86,90]. Kích thước đuôi của TKT 24 lại tương đối ngắn hơn so với các TKT đã công bố trên. Kích thước đuôi của TKT 24 chỉ 174 nm khi ở trạng thái duỗi, ngắn hơn so với chủng CP -51 (185 nm); vB_BceM_Bc431v3

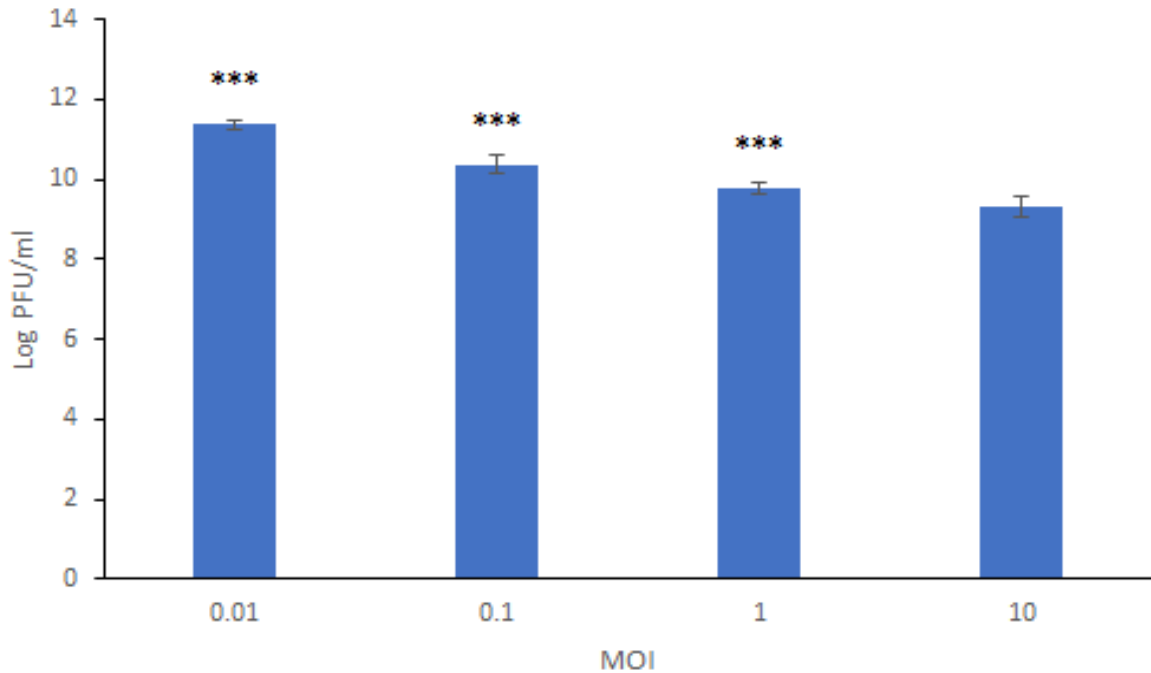
(180 ± 3 nm); FWLBc1 (210 ± 25 nm); FWLBc2 (219 ± 10 nm); BPS10C, BPS13 (193,5 nm) [77,79,91,92].

Theo Gillis và cộng sự (2014), TKT xâm nhiễm nhóm vi khuẩn *B. cereus* thường thuộc bộ *Caudovirales*. Cho đến nay, chưa có báo cáo nào về thực khuẩn thể xâm nhiễm nhóm vi khuẩn này thuộc dạng sợi [93]. Từ các dữ liệu được phân tích, thực khuẩn thể xâm nhiễm *B.cereus* thuộc họ *Myoviridae* khá phổ biến [93]. Ngoài ra, có nhiều báo cáo phân tích TEM trước đây xác định hình thái TKT *B.cereus* cũng là một phần thuộc họ *Siphoviridae* [76,77,82], một số ít báo cáo TKT *B.cereus* thuộc họ *Podoviridae* [69,94] hay họ *Tectiviridae* [95]. Các thực khuẩn thể có đuôi thường được báo cáo có đầu 30 – 160 nm và chiều dài đuôi từ 10 – 800nm [96].

3.4. Kết quả xác định hệ số đa nhiễm virus (MOI) *in vitro*

Theo Abedon và cộng sự (2017) MOI là tỷ lệ giữa tác nhân lây nhiễm với mục tiêu lây nhiễm và tỷ lệ này có thể được kiểm soát bằng cách điều chỉnh mật độ tương ứng của các tác nhân và vật chủ lây nhiễm [97]. Theo Silva và cộng sự (2014), MOI rất quan trọng trong hiệu quả gây bất hoạt của vi khuẩn [98]. Do đó, trước khi xác định ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến hoạt lực của TKT cần phải xác định MOI tối ưu được sử dụng.

Kết quả xác định MOI được trình bày ở Hình 3.5. Dựa vào Hình 3.5 có thể thấy tại MOI 0,01 mật độ TKT 24 đạt giá trị cao nhất (khoảng 2.3×10^{11} PFU/ml tương đương $5 \pm 0,11$ log) so với mật độ TKT ban đầu sau 3,5 giờ thí nghiệm. Tại MOI 0,1 mật độ TKT tăng lên $3 \pm 0,1$ log. Cuối cùng, mật độ TKT chỉ tăng lên $1,4 \pm 0,01$ log và $1,0 \pm 0,08$ log tương ứng với MOI 1 và 10. Sự khác biệt về mật độ TKT ở các giá trị MOI khác nhau là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Từ những kết quả này có thể thấy, TKT xâm nhiễm vi khuẩn hiệu quả nhất với tỷ lệ 0,01. Với MOI 0,1; 1; 10 đều thấy được có sự nhân lên của TKT tuy nhiên chưa đạt giá trị cao, đặc biệt tại MOI 10 có thể thấy lượng TKT tăng lên chỉ vào khoảng 1 log sau 3,5 giờ thử nghiệm, thấp nhất trong các tỷ lệ được khảo sát. Điều này thể hiện mặc dù lượng TKT lớn hơn số tế bào chủ nhưng sự xâm nhiễm tế bào lại không đạt hiệu quả.



Hình 3. 5. Kết quả xác định tỷ lệ lây nhiễm (MOI) (ý nghĩa thống kê được thực hiện bằng cách so sánh giá trị mỗi giá trị MOI với giá trị của MOI 10. Giá trị trung bình của ba xét nghiệm độc lập được hiển thị. Dấu hoa thị cho biết sự khác biệt có ý nghĩa: *** $p \leq 0,001$)

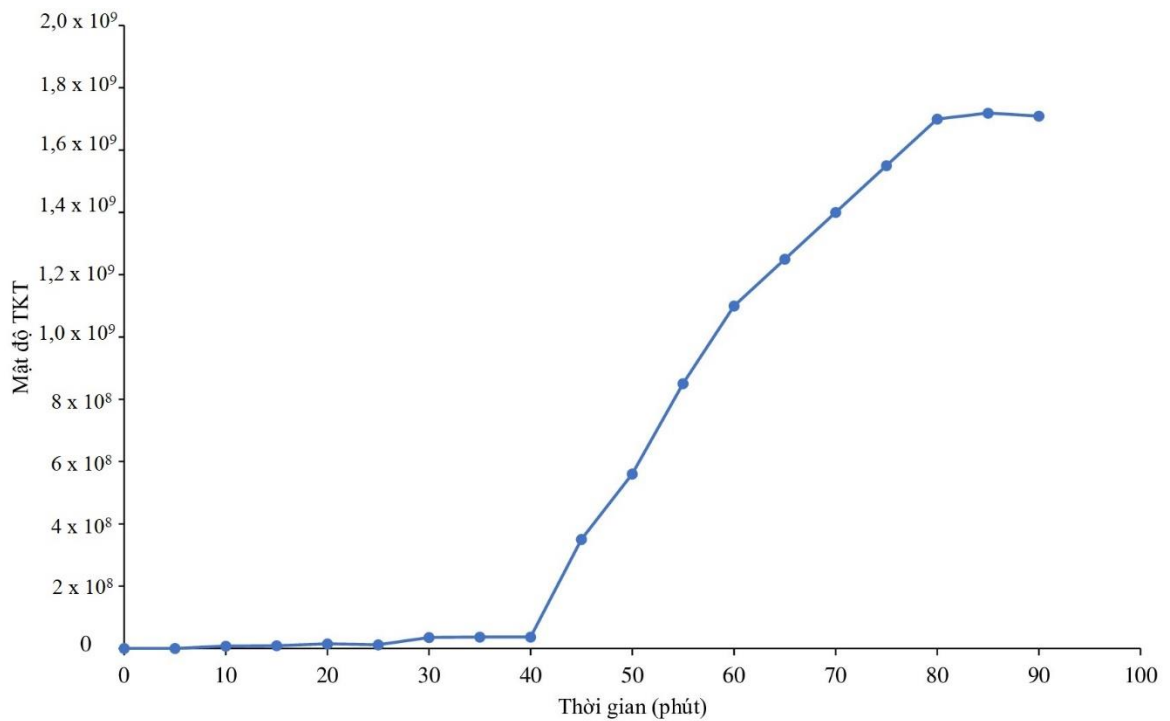
Theo nghiên cứu của Xiuling Ji và cộng sự (2015), TKT WMY22 tăng lên khoảng 4 log sau 4 giờ thí nghiệm ở MOI 0.1 cao nhất trong số 6 tỷ lệ MOI được nghiên cứu. Ở các MOI >1, kết quả mật độ TKT đếm được chỉ tăng khoảng 1 log so với TKT đầu vào và tại MOI 100 số lượng TKT tăng thấp nhất. Theo Kasman và cộng sự (2002), tuy nồng độ vi khuẩn không ảnh hưởng đến việc nhân lên của thực khuẩn thể nhưng ở số lượng TKT đầu vào cao hơn số lượng tế bào vi khuẩn kí chủ thì số lượng TKT con cháu được sinh ra thấp [99].

Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng việc sử dụng phage trên bề mặt bị ô nhiễm của thực phẩm làm giảm số lượng vi khuẩn và đảm bảo an toàn thực phẩm [100]. Khi một TKT độc lực xâm nhập vào tế bào chủ, nó sẽ nhân lên và ly giải tế bào, dẫn đến sự bùng phát các hạt virus. Do đó, với mỗi lần ly giải tế bào chủ, số lượng TKT sẽ tăng lên. Tuy nhiên, nếu tỷ lệ TKT cao có thể ly giải vi khuẩn mà không có sự nhân lên của TKT. Trong quá trình ly giải mà không có sự nhân lên, TKT hấp thụ vào bề mặt của tế bào chủ ở tỷ lệ MOI cao (> 100) và ly giải tế bào chủ tại nhiều vùng bề mặt tế bào dẫn đến cái chết

của vật chủ giống như sự ly giải [101]. Tỷ lệ MOI thấp có lợi cho tính khả thi thương mại của ứng dụng quy mô lớn vì nó làm giảm chi phí chuẩn bị, tinh sạch và ứng dụng của thể thực khuẩn [102].

3.5. Kết quả xây dựng đường cong sinh trưởng đơn bậc

Thời kì tiềm tàng là khoảng thời gian TKT được hấp phụ cho đến khi ly giải màng tế bào và trước khi giải phóng ra ngoài [103]. Xác định được đường cong sinh trưởng sẽ giúp tìm ra thời điểm thu nhận TKT với hiệu suất cao nhất.



Hình 3. 6. Đường cong sinh trưởng của TKT 24

Dựa vào Hình 3.6, có thể thấy TKT 24 có thời kì tiềm tàng vào khoảng 40 phút. Sau 40 phút trở đi số lượng TKT được giải phóng ra môi trường tăng lên đáng kể, cùng với sự nhân lên của TKT là sự giảm đi của số lượng vi khuẩn, độ đục của môi trường dần giảm đi. Mật độ quang đo được sau 80 phút giảm xuống thấp nhất, ở thời điểm này vi khuẩn đã bị ly giải gần như hoàn toàn và trong môi trường chỉ còn sót lại xác vi khuẩn. Nồng độ của vi khuẩn tại thời điểm này cũng được khảo sát, chúng tôi nhận thấy có sự giảm mật độ đáng kể $6,2 \pm 0,3$ log so với mật độ tế bào ban đầu. Trong thời gian

này lượng TKT đạt đến cao nhất và gần như không thay đổi có thể lý giải là do vi khuẩn đã gần như bị ly giải hoàn toàn.

Số lượng TKT mới được sinh ra từ một tế bào bị xâm nhiễm được gọi là hệ số nhân virus hay burst size [104]. Hệ số này có thể được tính trực tiếp từ đường cong sinh trưởng bằng cách lấy số lượng PFU trung bình tại pha cân bằng chia cho số tế bào vật chủ bị xâm nhiễm [67]. Từ công thức trên, chúng tôi tính được hệ số nhân virus trung bình của TKT 24 là 63 ± 3 TKT xâm nhiễm mỗi một tế bào kí chủ.

Lee và cộng sự (2011) đã báo cáo hai thể thực khuẩn FWLBc1 và FWLBc2 có thời kì tiềm tàng dài 93 phút đối với FWLBc1 và 84 phút đối với FWLBc2, cả 2 dòng TKT đều có hệ số nhân virus lớn lần lượt là 322 và 300 PFU trên 1 tế bào vật chủ [77]. Li và cộng sự (2020) đã nghiên cứu đặc trưng tăng trưởng của TKT có kí hiệu DLc1 trên kí chủ *B. cereus* 1582-3B, các tác giả cho thấy thời kì tiềm tàng là 31 phút với hệ số nhân virus trung bình là 20 PFU/tế bào bị xâm nhiễm [69]. Hệ số nhân virus của TKT WMY22 vào khoảng 78 PFU/tế bào ở 15°C với thời kì tiềm tàng là 70 phút [94]. Đặc điểm sinh trưởng của thể thực khuẩn Bc431v3 trên chủng vi khuẩn *B. cereus* LJH 431 có thời kì tiềm tàng 85 phút với hệ số nhân virus là 318 PFU/tế bào. So sánh với các TKT ly giải *B.cereus* khác, TKT 24 có thời gian tiềm tàng ngắn hơn FWLBc1 (93 phút), FWLBc2 (84 phút), Bc431v3 (85 phút), WMY22 (70 phút), nhưng dài hơn DLc1 (31 phút); hệ số nhân virus của TKT 24 thấp hơn FWLBc1 (322 PFU/tế bào), FWLBc2 (300 PFU/tế bào), Bc431v3 (318 PFU/tế bào), WMY22 (78 PFU/tế bào) và lớn hơn gấp 3 lần so với thể thực khuẩn DLc1 (20 PFU/tế bào).

Theo Abedon (2001) hệ số nhân virus có liên quan đến thời kì tiềm tàng, thông thường với thời kì tiềm tàng dài thì hệ số nhân lớn, với thời kì tiềm tàng ngắn thì hệ số nhân nhỏ hơn; ông cũng thử nghiệm các điều kiện môi trường nhằm tìm ra thời kì tiềm tàng tối ưu, tuy nhiên các điều kiện trong phòng thí nghiệm còn có nhiều khác biệt với môi trường phát triển của TKT bên ngoài phòng thí nghiệm [105]. Việc tối đa hóa tốc độ phát triển của TKT có liên quan đến tối ưu thời gian sinh sản (generarion time) và hệ số nhân virus [87].

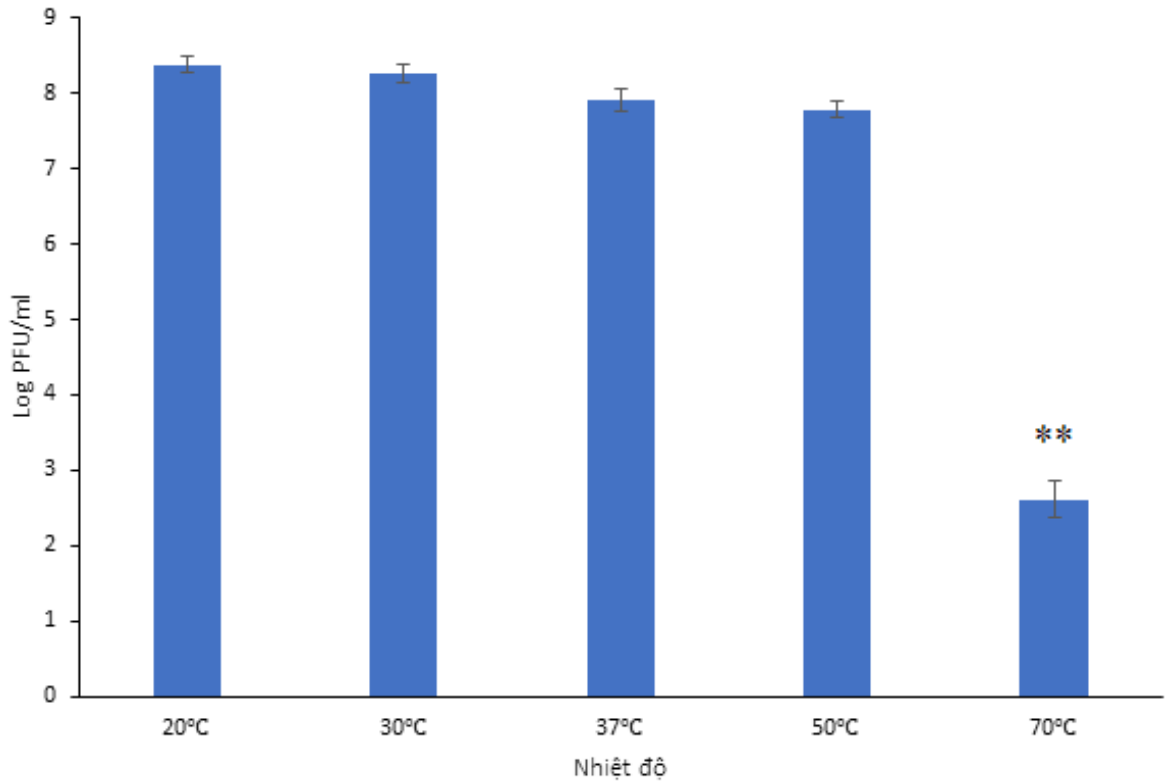
Thử nghiệm các điều kiện ảnh hưởng đến thời kì tăng trưởng của thực khuẩn nhằm tối ưu hóa khả năng phát triển, tối ưu hoá quy trình sản xuất, ứng dụng quy mô pilot hoặc công nghiệp.

3.6. Kết quả xác định các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến tính ổn định của TKT 24

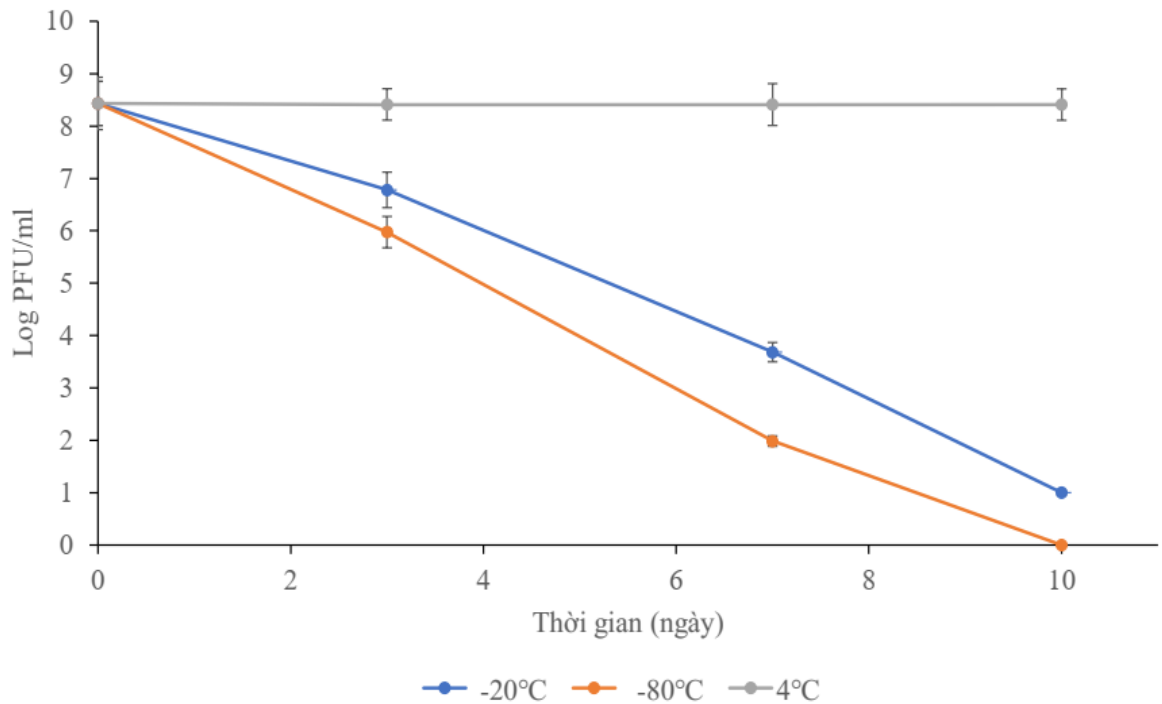
3.6.1. Kết quả xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự ổn định của TKT

Nhiệt độ đóng một vai trò quan trọng trong việc gắn, xâm nhập, nhân lên của TKT trong tế bào vật chủ và kéo dài thời kỳ tiềm ẩn (trong trường hợp TKT ôn hòa). Ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối ưu, vật chất di truyền của TKT ít xâm nhập vào tế bào chủ vi khuẩn hơn, do đó, thực khuẩn thể tổng hợp được ít hơn. Ở nhiệt độ cao hơn có thể kéo dài thời gian của giai đoạn tiềm tàng [87]. Bên cạnh đó, TKT có khả năng chịu nhiệt tốt, hoạt động tốt trong giải nhiệt độ rộng cũng là yếu tố quan trọng trong các ứng dụng sau này.

Để đánh giá được ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của TKT, dịch TKT ($2,0 \times 10^8$ PFU/mL) được ủ các nhiệt độ 20°C, 30°C, 37°C, 50°C, 70°C trong vòng 1 giờ; và tại các nhiệt độ -80°C, -20°C, 4°C, mật độ TKT được khảo sát sau 3, 7, 10 ngày, kết quả được ghi nhận và thể hiện ở Hình 3.7 và Hình 3.8.



Hình 3. 7 . Kết quả khảo sát điều kiện nhiệt độ ảnh hưởng đến TKT 24 (ý nghĩa thống kê được thực hiện bằng cách so sánh giá trị ở các nhiệt độ với giá trị ở nhiệt độ 37°C. Giá trị trung bình của ba xét nghiệm độc lập được hiển thị. Dấu hoa thị cho biết sự khác biệt có ý nghĩa: ** $p \leq 0,01$)



Hình 3. 8 . Kết quả khảo sát nhiệt độ lạnh TKT 24

Dựa vào Hình 3.7, 3.8 chúng tôi nhận thấy TKT 24 có tính ổn định cao ở dải nhiệt độ từ 4°C đến 50°C. Ở 20 - 30°C, mật độ TKT không có sự thay đổi đáng kể theo thời gian ($p > 0.05$); trong khi đó, mật độ TKT giảm $0,4 \pm 0,15$ log ở 37°C và $0,6 \pm 0,2$ log ở 50°C, và mật độ TKT giảm mạnh nhất ở 70°C (giảm $5,7 \pm 0,12$ log PFU) sau 1 giờ ủ. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tính ổn định của TKT đã được chỉ ra trong nhiều nghiên cứu trước. Khả năng hoạt động ở dải nhiệt độ lớn cũng được ghi nhận ở TKT DLc1 (4 đến 55°C), theo đó hoạt tính giảm nhanh chóng từ 65°C và mất hoàn toàn hoạt tính sau 1 giờ ủ ở 75°C [69]. Ngược lại, TKT VMY22 được phân lập từ sông băng Mingyong thuộc tỉnh Vân Nam, Trung Quốc có khả năng chịu nhiệt độ cao tương đối kém khi tỷ lệ TKT sống sót giảm gần 30% chỉ sau 10 phút tại 40°C và chỉ còn lại 40% sau 1 giờ [94]. Đặc điểm chống chịu nhiệt độ có thể có liên quan đến đặc điểm môi trường phân lập TKT, khi TKT phân lập từ đất có khả năng chịu nhiệt độ cao lên đến 50°C và gần như bị mất hoạt tính ở nhiệt độ thấp, trong khi TKT phân lập từ môi trường có điều kiện nhiệt độ lạnh hơn như sông băng thì ngược lại [94].

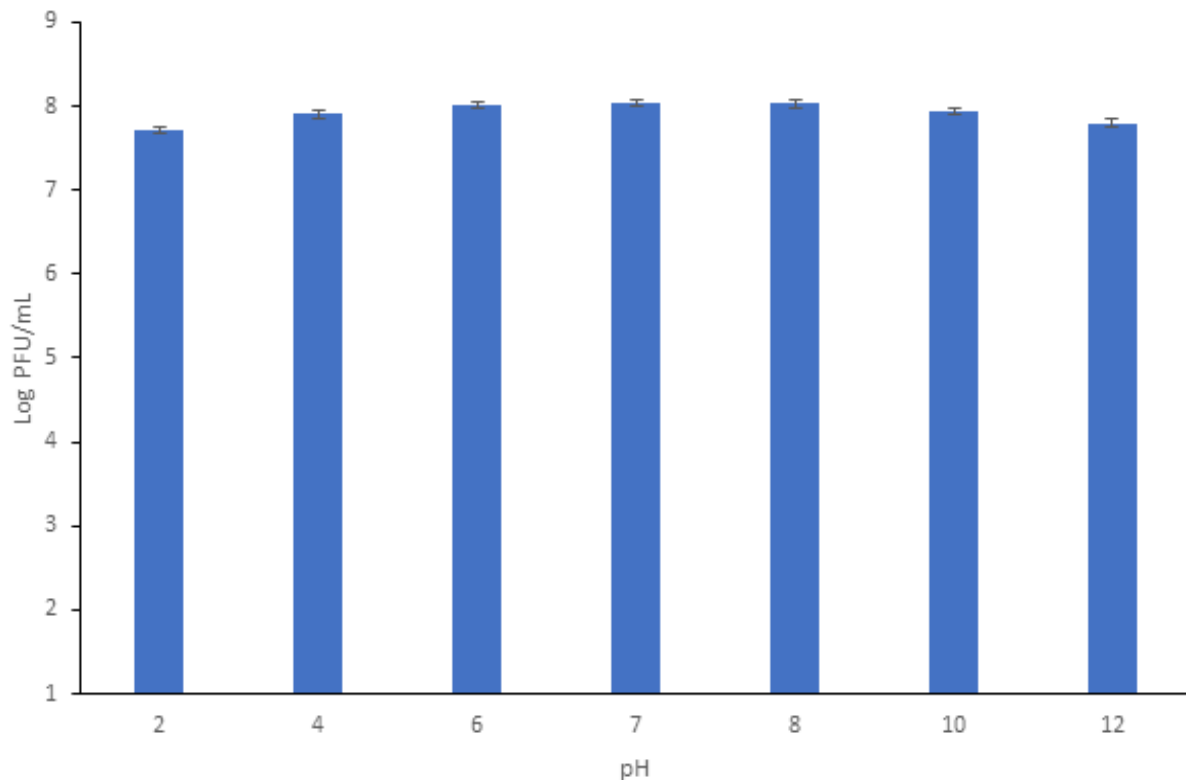
Theo kết quả ở Hình 3.8, mật độ TKT 24 không thay đổi sau 10 ngày ở 4°C, trong khi ở các điều kiện nhiệt độ khác (-20°, -80°C), chúng tôi ghi nhận sự giảm 2 – 3 log PFU chỉ sau 3 ngày bảo quản. Sau 7 ngày, mật độ TKT giảm đi 4,7 log ở điều kiện -20°C và 6,4 log ở điều kiện -80°C. Sau 10 ngày bảo quản ở -80°C thì TKT hoàn toàn bị mất hoạt tính; ở -20°C mật độ còn lại không đáng kể (~10 PFU/mL). Kết quả trên tương tự với hai TKT FWLBc1 và FWLBc2 được phân lập từ đất thu thập ở New Zealand đã được báo cáo ổn định tốt ở 4°C hơn là ở -80°C với tất cả điều kiện môi trường, đệm hoặc glycerol [77]. TKT DLc1 được bảo quản lên tới 1 năm ở 4°C mà không có sự thay đổi nhiều về mật độ [69]. Thorne và Holt (1974) đã quan sát thấy TKT *Bacillus cereus* CP-51 nhạy cảm với nhiệt độ thấp và sống sót tốt hơn ở nhiệt độ phòng, nhiệt độ tối ưu cho sự ổn định của TKT CP-51 là 15°C [106]. Theo các tác giả, môi trường dinh dưỡng chiết xuất nấm men (NBY) đã ổn định TKT trong điều kiện lạnh. Sau khi bổ sung NBY, TKT pha loãng 10 lần vẫn giữ được 36% hoạt tính sau 7 giờ và 19% sau 24 giờ ở 0°C. Khi các mẫu được bảo quản ở 15 ° C, không quan sát thấy sự bất hoạt khi chúng được pha loãng 10 lần trong NBY. Khả năng ly giải vẫn còn được quan sát thấy trong 2

tuần. Theo kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử, CP-51 có đầu hình lục giác và đuôi dài co lại được [107]. Như đã được chứng minh bởi Ackermann và cộng sự (2004), TKT có đuôi là loài có khả năng ít bị thoái hóa nhất khi lưu trữ và thể hiện khả năng sống sót lâu nhất; một số loài có thể tồn tại sau 10 – 12 năm ở 4°C [108].

Kết quả nghiên cứu cho thấy TKT 24 có khả năng chịu điều kiện đông lạnh kém. Do đó, ở nghiên cứu sắp tới, chúng tôi sẽ thử nghiệm xác định loại môi trường hoặc thành phần hóa chất có thể giúp TKT 24 ổn định ở nhiệt độ thấp. Trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu này, TKT được lưu trữ ở 4°C và thường xuyên được nhân giống mới để đảm bảo mật độ cũng như hoạt tính của TKT.

3.6.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự ổn định của TKT 24

Theo Jończyk-Matysiak và cộng sự (2018) pH môi trường là một trong những điều kiện quan trọng nhất hạn chế sự tồn tại của vi khuẩn, do đó cũng là yếu tố chính hạn chế hoạt động của TKT [107].



Hình 3. 9. Kết quả ảnh hưởng của pH đến TKT

Kết quả thể hiện tại Hình 3.9 cho thấy TKT 24 có tính ổn định tốt ở dải pH rộng (pH 2 – 12), tối ưu nhất ở pH 6 – 8 khi mật độ TKT đếm được sau khi ủ 1 giờ gần như không thay đổi so với ban đầu ($\sim 10^8$ PFU/ml). Mật độ TKT tại pH 2 và 12 giảm đi không đáng kể chỉ 0,3 log sau 1 giờ thí nghiệm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Li và cộng sự (2020), các tác giả này cũng chỉ ra rằng TKT *Bacillus cereus* vB_BceP-DLc1 không thay đổi nhiều về mật độ và ổn định ở dải pH tương đối rộng 5 – 11. Khả năng chịu pH của TKT phân lập phụ thuộc vào địa điểm, môi trường mà chúng phân lập. Điều này đã được chỉ ra trong các nghiên cứu trước đó. Shin và cộng sự (2014) cho thấy hai TKT BPS10C và BPS13 chỉ ổn định ở dải pH 6 – 8, tối ưu nhất ở pH 6; cả hai TKT đều mất hoạt tính ở pH 2 và 10,5; TKT BPS13 còn giữ được hoạt tính ở pH 4,3 và 9,5 nhưng mật độ đã giảm tương ứng đến 6 và 4 log [92]. Hai TKT BaceFT01 và BaceCM02 được phân lập từ dịch đậu tương lên men đều giữ được hơn 60% hoạt tính ở dải pH từ 6 đến 10, và mất hoạt tính hoàn toàn ở điều kiện pH < 4 và pH > 13, bên cạnh đó các tác giả quan sát thấy sự kết tủa của TKT khi ở điều kiện acid [109]. TKT phân lập ở vùng khí hậu lạnh có khả năng chịu lạnh tốt, Ji và cộng sự (2015) cho thấy TKT VMY22 thể hiện sự ổn định ở nhiệt độ thấp và hoạt động tốt ở dải pH từ 5 đến 9 và tối ưu nhất ở pH 8 [94].

Thông thường, các nghiên cứu về hoạt tính ly giải của vi khuẩn đã chỉ ra rằng hoạt tính của TKT kém hiệu quả hơn ở pH nhỏ hơn 5 và lớn hơn 10 và tối ưu nhất ở pH trung tính từ 6–8 [110,111]. Một thể thực khuẩn có khả năng xâm nhiễm sẽ gắn vào một vị trí thụ thể trên bề mặt tế bào vi khuẩn bằng cách sử dụng lysozyme của thể thực khuẩn để phá vỡ thành tế bào vi khuẩn. Quá trình này rất quan trọng đối với sự xâm nhiễm của thực khuẩn thể. Tuy nhiên, pH có thể ảnh hưởng đến hoạt động của enzym lysozyme và với các protein capsid khác, do đó ngăn cản sự hấp phụ của thực khuẩn vào các vị trí thụ thể trên tế bào vật chủ [112].

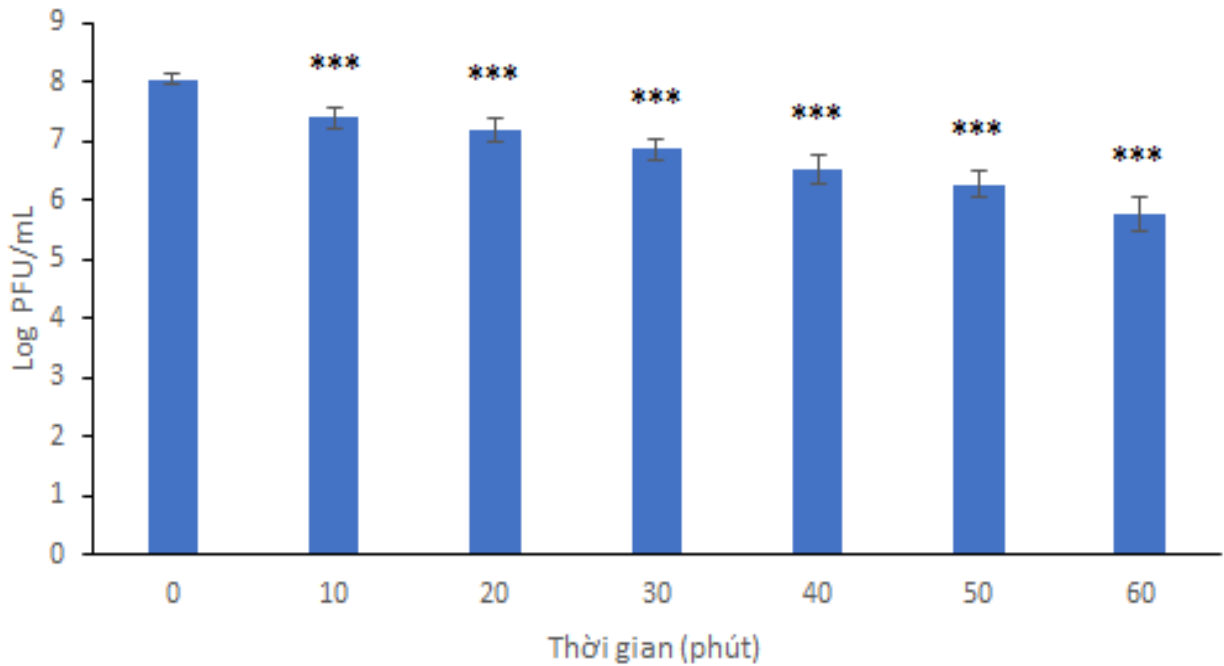
Mặc dù hầu hết TKT đều ổn định ở pH trung tính [98], nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hoạt tính của TKT 24 hầu như không bị ảnh hưởng dù ở giá trị pH thấp hơn pH trung tính. Khả năng chịu pH phổ rộng của TKT 24 gợi ý tiềm năng ứng dụng của TKT này trong việc phát triển chế phẩm sinh học để kiểm soát sự lây nhiễm của *B. cereus* trong quá trình chế biến và bảo

quản thực phẩm. TKT 24 sẽ vẫn giữ được hoạt tính khi được áp dụng vào các loại thực phẩm có tính acid như thực phẩm lên men (kim chi, đậu lên men,...) hoặc các loại thực phẩm rau xanh, đậu hũ,...có tính kiềm.

3.6.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tia cực tím đến TKT

Một nguyên nhân quan trọng gây chết TKT trong tự nhiên là tia cực tím (UV). UV được biết là gây tổn thương, đột biến hoặc gây chết cho vi sinh vật, nó cũng là nguyên nhân chính gây chết TKT trong các môi trường có tiếp xúc với ánh sáng mặt trời. Từ góc độ ứng dụng, TKT chết do tia cực tím gây ra là một trở ngại lớn đối với việc sử dụng rộng rãi và linh hoạt TKT trong ngành công nghiệp thực phẩm. Liệu pháp TKT ngày càng được chú trọng trong sản xuất thực phẩm vì nhiều ưu điểm của nó. Để cân nhắc một dòng TKT có thích hợp để ứng dụng trong đời sống hay không cần xem xét tác động của UV đối với sự phát triển của TKT.

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách cho TKT phơi nhiễm tia UV (bước sóng 254nm), khoảng cách từ mẫu thí nghiệm đến nguồn chiếu tia là 0,6m và xác định mật độ ở các thời điểm cụ thể. Các kết quả thu nhận được thể hiện ở Hình 3.10, theo đó, mật độ TKT 24 giảm dần theo thời gian tiếp xúc với tia cực tím. Mật độ giảm 0,8 log sau 20 phút chiếu tia, giảm 1,5 log sau 40 phút và 2,3 log sau 60 phút tiếp xúc với tia cực tím.



Hình 3. 10. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của UV đối với sự ổn định của TKT (ý nghĩa thống kê được thực hiện bằng cách so sánh giá trị ở các thời gian khác nhau với thời điểm 0 phút. Giá trị trung bình của ba xét nghiệm độc lập được hiển thị. Dấu hoa thị cho biết sự khác biệt có ý nghĩa: *** $p \leq 0,001$)

Các kết quả nghiên cứu cho thấy, TKT 24 có khả năng chống chịu tia cực tím tương đối tốt, kết quả này có thể được giải thích do môi trường nơi TKT 24 được phân lập là phần đất trên bề mặt, do đó thường xuyên tiếp xúc với bức xạ mặt trời, và đây có thể là sự chọn lọc tự nhiên giúp cho TKT 24 chống chịu tia cực tím tốt hơn. Giả thuyết của chúng tôi được củng cố bởi các nghiên cứu trước đó, thực khuẩn thể xâm nhiễm *Brucella abortus* phân lập từ nước thải cống ngầm được báo cáo mất hoàn toàn hoạt tính chỉ sau 3 phút tiếp xúc với tia UV [113], do các TKT phân lập trong nước cống ngầm ít tiếp xúc với bức xạ mặt trời do đó khả năng chịu bức xạ tia UV kém. Tương tự, Phongtang và cộng sự (2021) đã kiểm tra khả năng chống chịu tia cực tím của hai thực khuẩn thể BaceFT01 và BaceCM02 phân lập từ đậu nành lên men, các TKT này cũng ít tiếp xúc với tia cực tím, cả hai TKT đều giữ được hoạt tính sau 15 phút chiếu tia, tuy nhiên bất hoạt hoàn toàn sau 60 phút [109].

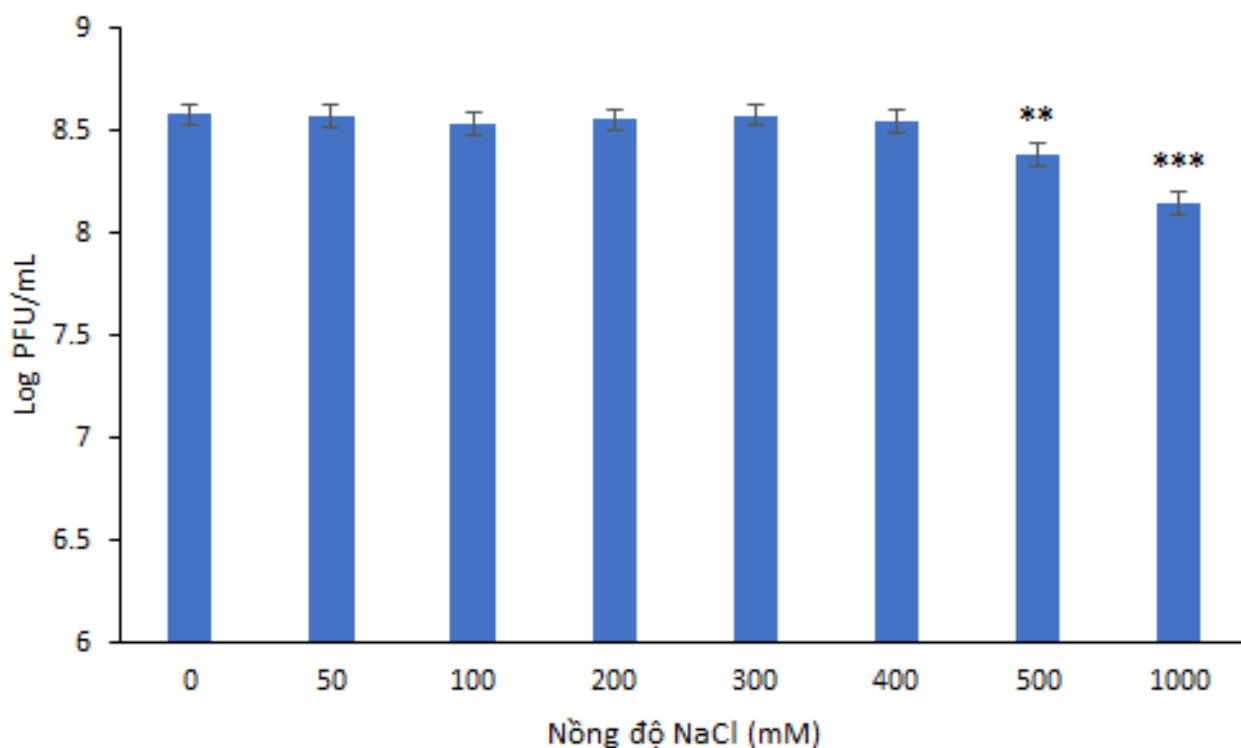
Tùy vào mục đích sử dụng, nếu TKT được phun trực tiếp lên thực phẩm hoặc bề mặt thiết bị có thể sẽ gặp phải điều kiện khắc nghiệt như tia cực tím sẽ dẫn đến việc mất khả năng xâm nhiễm của TKT và làm giảm hiệu quả khử

trùng [114], do đó việc sàng lọc được TKT có khả năng chịu được tia cực tím tốt sẽ có ý nghĩa lớn trong sản xuất và ứng dụng của TKT.

3.6.4. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến tính ổn định của TKT

Bacillus cereus được báo cáo có khả năng chịu mặn tốt lên đến 10% NaCl [115], cùng với khả năng tạo bào tử và màng sinh học khiến *B.cereus* là một trong những tác nhân gây ô nhiễm thường xuyên được tìm thấy ở các loại thực phẩm có hàm lượng muối cao như thịt, rau củ muối,... [76,116]. Do đó nếu các TKT không có khả năng chịu muối tốt sẽ khó có khả năng tiêu diệt nhóm vi khuẩn này. Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát khả năng chịu mặn của TKT 24.

Nghiên cứu sự ảnh hưởng của nồng độ NaCl được thực hiện bằng cách trộn dịch TKT tinh sạch với mật độ đã biết (10^8 PFU/ml) với dung dịch NaCl có nồng độ khác nhau (thể tích 2 dung dịch bằng nhau), kết quả thử nghiệm được thể hiện ở Hình 3.11.



Hình 3. 11. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến tính ổn định của TKT (ý nghĩa thống kê được thực hiện bằng cách so sánh giá trị ở các nồng độ NaCl khác nhau với nồng độ NaCl 0mM. Giá trị trung bình của ba xét nghiệm độc lập được hiển thị. Dấu hoa thị cho biết sự khác biệt có ý nghĩa: ** $p \leq 0,01$ và *** $p \leq 0,001$)

Mật độ TKT 24 gần như không thay đổi ở nồng độ muối từ 0 – 400mM ($p > 0,05$) và chỉ giảm nhẹ 0,2 log ở 500 mM và 0,5 log ở 1M. Sự sai khác về nồng độ TKT ở điều kiện 500mM và 1M đối với các điều kiện còn lại có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Điều này thể hiện rằng TKT 24 bị ảnh hưởng bởi nồng độ NaCl ≥ 500 mM. Kết quả này cho thấy TKT 24 có khả năng chịu mặn khá tốt và cũng tương đồng với các báo cáo của Li và cộng sự (2020), các tác giả này cũng phân lập được TKT DLc1 chịu được độ muối lên đến 500mM và chỉ giảm nhẹ ở 1 M.

Ahmandi và cộng sự (2017) đã báo cáo TKT P100 và A511 ly giải *L.monocytogenes* vẫn hoạt động tốt ở nồng độ NaCl 2 – 3,5%, là nồng độ muối thường gặp ở sản phẩm thịt ăn liền [117]. Một số nghiên cứu khác cũng phân lập được TKT chịu mặn tốt trong phô mai muối, vì quá trình làm phô mai yêu cầu nồng độ muối cao, thông thường là 1,5 – 2,3% tùy từng loại phô mai [118]. Đã có những báo cáo về phân lập và sử dụng TKT kiểm soát

Staphylococcus aureus, *L.monocytogenes* trong các sản phẩm từ sữa bao gồm phô mai đã được công bố trên thế giới [114]. Tế bào thực khuẩn có yêu cầu về muối ở nồng độ thấp để tăng khả năng lây nhiễm và tăng trưởng. Ở nồng độ thấp, các ion muối tương tác với protein và ổn định cấu trúc protein bằng cách trung hòa điện tích của protein. Tuy nhiên, với nồng độ cao hơn, NaCl làm tăng khả năng biến tính nhiệt của protein và có thể gây ảnh hưởng xấu đến sự ổn định cấu trúc của axit nucleic của TKT. Khả năng chịu đựng độ mặn của TKT đã được công bố trong nhiều nghiên cứu trước đó, nồng độ muối tối ưu của một thực khuẩn thể *V. anguillarum* được phân lập từ ao nuôi cá từ 15 - 45 g/l. Các tác giả này cũng cho thấy, khi bảo quản thể thực khuẩn *V. vulnificus* ở 4°C với nồng độ muối 22 g/l và ở 30°C với nồng độ muối 10 g/l, chúng vẫn duy trì hoạt tính sau 52 ngày lưu trữ.

Seaman và Day (2007) đã phân lập thành công TKT từ một mẫu đất của một bãi muối ở Oklahoma (Mỹ). Độ mặn của mạch nước ngầm ở khu vực này dao động trong khoảng 4% đến 37% và độ mặn của đất từ 0,3% đến 27%. Một trong những TKT được phân lập được tại khu vực này là Φ gspC thuộc họ *Myoviridae*, có bộ gen lớn bất thường (340 kb). Phân tích hệ gen của Φ gspC, các tác giả cho rằng chúng mang các gen mã hóa cho các protein giúp chúng thích nghi tốt trong môi trường có nồng độ muối cao [119].

Theo Hidaka (1971), khả năng chịu mặn ở nồng độ tương đương với độ mặn của môi trường sinh trưởng của TKT. Tác giả đã thử nghiệm tính ổn định của 5 chủng thực khuẩn thể biển trong môi trường có bổ sung các loại muối vô cơ khác nhau (nước cất, NaCl 5%, NaCl 3%, nước biển nhân tạo pha loãng sáu lần, nước biển nhân tạo và môi trường có chứa nước biển). Qua quan sát, họ nhận thấy rằng tất cả các TKT gần như bị bất hoạt trong môi trường chứa 0,5% NaCl so với các môi trường được thí nghiệm còn lại. Những quan sát đó cho thấy các TKT có khả năng xâm nhiễm vi khuẩn mạnh nhất ở nồng độ muối gần tương đương với nước biển, nguồn phân lập ban đầu của chúng [110].

Theo Thorne và Holt (1974), việc bổ sung 10 mmol/L Mg^{2+} vào môi trường NBY có thể bảo vệ TKT CP-51 khỏi sự bất hoạt trong điều kiện nhiệt độ bất lợi. CP-51 đã được báo cáo với khả năng chịu lạnh kém hoàn toàn không quan sát sự bất hoạt khi ủ trong 1 giờ ở 0 °C trong môi trường NBY

pH 6,8 có chứa các ion Mg^{2+} . Trong khi đó, ở cùng một điều kiện nhiệt độ và pH, hiệu giá TKT CP-51 ban đầu đã bị giảm đi 60% khi được ủ trong môi trường không có Mg^{2+} [106]. Kết quả này gợi ý việc bổ sung muối hoặc các ion kim loại để tăng khả năng hoạt động của TKT. Với khả năng chịu được nồng độ NaCl cao, TKT 24 cho thấy được tiềm năng ứng dụng của chúng trong chế biến và bảo quản thực phẩm nhằm hạn chế sự lây nhiễm và phát triển của *B. cereus*.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phân lập được 17 chủng thực khuẩn thể có khả năng ly giải các chủng *Bacillus cereus* và lựa chọn được thực khuẩn thể số 24 (TKT 24) có hoạt tính ly giải mạnh nhất. Phân loại TKT 24 thuộc họ *Myoviridae*, bộ *Caudovirales*. Xác định được MOI tối ưu của thực khuẩn thể số 24 là 0,01; thời gian tiềm ẩn khoảng 40 phút, giải phóng lượng thực khuẩn thể mới trung bình đạt 63 PFU/tế bào xâm nhiễm.
2. Xác định được một số đặc điểm của TKT 24: (1) Ổn định ở nhiệt độ 4 - 50°C; (2) chịu pH từ 2 – 12, tối ưu nhất ở pH 6 – 8; (3) có khả năng chịu tia cực tím tốt, giảm 0,8 log sau 20 phút chiếu tia, giảm 1,5 log sau 40 phút và 2,3 log sau 60 phút; (4) Chịu được nồng độ muối lên đến 400 mM, và giảm nhẹ ở 500 mM (0,2 log) và 1M (0,5 log).

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu đặc tính sinh hóa của các chủng thực khuẩn thể khác cũng như nghiên cứu tạo phức hợp thực khuẩn thể (phage cocktail) để phát triển và tạo chế phẩm thực khuẩn thể ứng dụng trong chế biến và bảo quản thực phẩm.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2018, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017, *EFSA Journal*, **16**(12), p. e05500.
2. Glasset, B., Herbin, S., Guillier, L., Cadel-Six, S., Vignaud, M.-L., Grout, J., Pairaud, S., Michel, V., Hennekinne, J.-A., and Ramarao, N., 2016, *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation, *Eurosurveillance*, **21**(48), p. 30413.
3. 70% số vụ ngộ độc thực phẩm là do sử dụng suất ăn từ nơi khác vận chuyển đến, Trang tin Điện tử Đảng bộ thành phố Hồ Chí Minh [Online]. Available: <http://www.hcmcpv.org.vn/tin-tuc/70-so-vu-ngo-doc-thuc-pham-la-do-su-dung-suat-an-tu-noi-khac-van-chuyen-den-1491866258>. [Accessed: 24-Sep-2022].
4. Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., and Granum, P. E., 2008, From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins, *FEMS Microbiol Rev*, **32**(4), pp. 579–606.
5. Griffiths, M. W., and Schraft, H., 2017, *Bacillus cereus* food poisoning, *Foodborne Diseases, Elsevier*, pp. 395–405.
6. Carroll, L. M., Wiedmann, M., and Kovac, J., 2020, Proposal of a Taxonomic Nomenclature for the *Bacillus cereus* Group Which Reconciles Genomic Definitions of Bacterial Species with Clinical and Industrial Phenotypes, *mBio*, **11**(1), pp. e00034-20.
7. Schoeni, J. L., and Lee Wong, A. C., 2005, *Bacillus cereus* Food Poisoning and Its Toxins, *Journal of Food Protection*, **68**(3), pp. 636–648.
8. Hauge, S., 1955, Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli, *Journal of Applied Bacteriology*, **18**(3), pp. 591–595.
9. Melling, J., Capel, B., Turnbull, P. C., and Gilbert, R. J., 1976, Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*., *Journal of Clinical Pathology*, **29**(10), pp. 938–940.
10. Simone, E., Goosen, M., Notermans, S. H., and Borgdorff, M. W., 1997, Investigations of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991 to 1994, *Journal of food protection*, **60**(4), pp. 442–446.

11. Raevuori, M., Kiutamo, T., Niskanen, A., and Salminen, K., 1976, An outbreak of *Bacillus cereus* food-poisoning in Finland associated with boiled rice, *Epidemiology & Infection*, **76**(3), pp. 319–327.
12. Baddour, L. M., Gaia, S. M., Griffin, R., and Hudson, R., 1986, A hospital cafeteria-related food-borne outbreak due to *Bacillus cereus*: unique features, *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **7**(9), pp. 462–465.
13. DeBuono, B. A., Brondum, J., Kramer, J. M., Gilbert, R. J., and Opal, S. M., 1988, Plasmid, serotypic, and enterotoxin analysis of *Bacillus cereus* in an outbreak setting, *Journal of clinical microbiology*, **26**(8), pp. 1571–1574.
14. Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., and Senesi, S., 2002, Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks, *FEMS microbiology letters*, **208**(1), pp. 129–134.
15. Wambo, G. K., Burckhardt, F., Frank, C., Hiller, P., Wichmann-Schauer, H., Zuschneid, I., Hentschke, J., Hitzbleck, T., Contzen, M., and Suckau, M., 2011, The proof of the pudding is in the eating: an outbreak of emetic syndrome after a kindergarten excursion, Berlin, Germany, December 2007, *Eurosurveillance*, **16**(15), p. 19839.
16. Al-Abri, S. S., Al-Jardani, A. K., Al-Hosni, M. S., Kurup, P. J., Al-Busaidi, S., and Beeching, N. J., 2011, A hospital acquired outbreak of *Bacillus cereus* gastroenteritis, Oman, *Journal of Infection and Public Health*, **4**(4), pp. 180–186.
17. ONLINE T. T., 2012, 30 học sinh nhiễm độc *Bacillus cereus* trong thức ăn, TUOI TRE ONLINE [Online]. Available: <https://tuoitre.vn/news-516036.htm>. [Accessed: 10-Oct-2022].
18. Zhou, G., Bester, K., Liao, B., Yang, Z., Jiang, R., and Hendriksen, N. B., 2014, Characterization of three *Bacillus cereus* strains involved in a major outbreak of food poisoning after consumption of fermented black beans (Douchi) in Yunan, China, *Foodborne Pathogens and Disease*, **11**(10), pp. 769–774.
19. Lentz, S. A. M., Rivas, P. M., Cardoso, M. R. de I., Morales, D. de L., Centenaro, F. C., and Martins, A. F., 2018, *Bacillus cereus* as the main casual agent of foodborne outbreaks in Southern Brazil: data from 11 years, *Cadernos de Saúde Pública*, **34**.

20. VietnamPlus, 2021, Vụ ngộ độc tập thể tại Phú Yên: Thực phẩm nhiễm khuẩn *Bacillus cereus* | Y tế | Vietnam+ (VietnamPlus), VietnamPlus [Online]. Available: <https://www.vietnamplus.vn/vu-ngo-doc-tap-the-tai-phu-yen-thuc-pham-nhiem-khuan-bacillus-cereus/693728.vnp>. [Accessed: 24-Sep-2022].
21. Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.-H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M., and Svensson, B., 2006, Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*, *FEMS microbiology letters*, **260**(2), pp. 232–240.
22. Hankin, M. E., 1896, The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes, *Ann. Inst. Pasteur*, **10**, pp. 511–523.
23. Twort, F. W., 1915, An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* ii: 1241–1243.
24. Maura, D., and Debarbieux, L., 2011, Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine, *Applied microbiology and biotechnology*, **90**(3), pp. 851–859.
25. Summers, W. C., 2001, Bacteriophage therapy, *Annual review of microbiology*, **55**, p. 437.
26. Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. B., and Momol, M. T., 2010, Phage therapy for plant disease control, *Curr Pharm Biotechnol*, **11**(1), pp. 48–57.
27. Kutateladze, áM, and Adamia, R., 2008, Phage therapy experience at the Eliava Institute, *Médecine et maladies infectieuses*, **38**(8), pp. 426–430.
28. Summers, W. C., 1999, *Felix DHerelle and the Origins of Molecular Biology*, *Yale University Press*.
29. Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., and Harper, D. R., 2010, Bacteriophage applications: where are we now?, *Letters in applied microbiology*, **51**(4), pp. 363–369.
30. Zink, R., and Loessner, M. J., 1992, Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(1), pp. 296–302.
31. Ackermann, H. W., 2001, Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review, *Arch Virol*, **146**(5), pp. 843–857.

32. Moineau, S., 2013, Bacteriophage, *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Elsevier, pp. 280–283.
33. Eriksson, H., 2015, *Bacterial Viruses Targeting Multi-Resistant Klebsiella Pneumoniae and Escherichia Coli*, Department of Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Stockholm.
34. Inal, J. M., 2003, Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics, *ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS-ENGLISH EDITION*-, **51**(4), pp. 237–244.
35. Boyd, E. F., and Brüssow, H., 2002, Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved, *Trends Microbiol*, **10**(11), pp. 521–529.
36. Cenens, W., Makumi, A., Mebrhatu, M. T., Lavigne, R., and Aertsen, A., 2013, Phage–host interactions during pseudolysogeny, *Bacteriophage*, **3**(1), p. e25029.
37. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris Jr, J. G., 2001, Bacteriophage therapy, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**(3), pp. 649–659.
38. Kutateladze, M., and Adamia, R., 2010, Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics, *Trends in biotechnology*, **28**(12), pp. 591–595.
39. Giamarellou, H., 2006, Treatment options for multidrug-resistant bacteria, *Expert review of anti-infective therapy*, **4**(4), pp. 601–618.
40. Shetty, N., and Wilson, A. P. R., 2000, Sitaflaxacin in the treatment of patients with infections caused by vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46**(4), pp. 633–638.
41. Lu, T. K., and Koeris, M. S., 2011, The next generation of bacteriophage therapy, *Current opinion in microbiology*, **14**(5), pp. 524–531.
42. Sulakvelidze, A., and Barrow, P., 2005, Phage therapy in animals and agribusiness, *Bacteriophages: biology and applications*, pp. 335–380.
43. Sillankorva, S. M., Oliveira, H., and Azeredo, J., 2012, Bacteriophages and their role in food safety, *International journal of microbiology*, **2012**.
44. Dibner, J. J., and Richards, J. D., 2005, Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action, *Poult Sci*, **84**(4), pp. 634–643.
45. Hagens, S., and Loessner, M. J., 2010, Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations, *Current pharmaceutical biotechnology*, **11**(1), pp. 58–68.

46. Havelaar, A. H., Manges, M.-J. J., De Koeijer, A. A., Bogaardt, M.-J., Evers, E. G., Jacobs-Reitsma, W. F., Van Pelt, W., Wagenaar, J. A., De Wit, G. A., and Van Der Zee, H., 2007, Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat, *Risk Analysis: An International Journal*, **27**(4), pp. 831–844.
47. Adriaenssens, E. M., Van Vaerenbergh, J., Vandenneuvel, D., Dunon, V., Ceysens, P.-J., De Proft, M., Kropinski, A. M., Noben, J.-P., Maes, M., and Lavigne, R., 2012, T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by “*Dickeya solani*,” *PloS one*, **7**(3), p. e33227.
48. Raya, R. R., Oot, R. A., Moore-Maley, B., Wieland, S., Callaway, T. R., Kutter, E. M., and Brabban, A. D., 2011, Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157: H7 levels in sheep guts, *Bacteriophage*, **1**(1), pp. 15–24.
49. Wall, S. K., Zhang, J., Rostagno, M. H., and Ebner, P. D., 2010, Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine, *Applied and environmental microbiology*, **76**(1), pp. 48–53.
50. O’flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W. J., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P., 2005, Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk, *Letters in applied microbiology*, **41**(3), pp. 274–279.
51. Karunasagar, I., Shivu, M. M., Girisha, S. K., Krohne, G., and Karunasagar, I., 2007, Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages, *Aquaculture*, **268**(1–4), pp. 288–292.
52. Prasad, Y., Kumar, D., and Sharma, A. K., 2011, Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) from columnaris disease., *Journal of environmental biology*, **32**(2), pp. 161–168.
53. Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T., 2011, Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages, *Applied and environmental microbiology*, **77**(12), pp. 4155–4162.
54. Authority, E. F. S., Prevention, E. C. for D., and Control, 2011, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009, *EFSA Journal*, **9**(3), p. 2090.

55. Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P., and Van Sinderen, D., 2011, Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens, Current opinion in biotechnology, **22**(2), pp. 157–163.
56. Carter, C. D., Parks, A., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Magnone, J., Senecal, A., Kropinski, A. M., and Sulakvelidze, A., 2012, Bacteriophage cocktail significantly reduces Escherichia coli O157: H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination, Bacteriophage, **2**(3), pp. 178–185.
57. Kim, K.-P., Klumpp, J., and Loessner, M. J., 2007, Enterobacter sakazakii bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula, International journal of food microbiology, **115**(2), pp. 195–203.
58. Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., De Meester, E. D., and Loessner, M. J., 2005, Bacteriophage P100 for control of Listeria monocytogenes in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application, Regulatory Toxicology and Pharmacology, **43**(3), pp. 301–312.
59. Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., and Sulakvelidze, A., 2003, Biocontrol of Listeria monocytogenes on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin, Applied and environmental microbiology, **69**(8), pp. 4519–4526.
60. García, P., Madera, C., Martínez, B., and Rodríguez, A., 2007, Biocontrol of Staphylococcus aureus in curd manufacturing processes using bacteriophages, International Dairy Journal, **17**(10), pp. 1232–1239.
61. Twest, R., and Kropinski, A. M., 2009, Bacteriophage Enrichment from Water and Soil, Bacteriophages, M.R.J. Clokie, and A.M. Kropinski, eds., Humana Press, Totowa, NJ, pp. 15–21.
62. Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., and Johnson, R. P., 2009, Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay, Bacteriophages, M.R.J. Clokie, and A.M. Kropinski, eds., Humana Press, Totowa, NJ, pp. 69–76.
63. Glonti, T., and Pirnay, J.-P., 2022, In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success, Viruses, **14**(7), p. 1490.
64. Abedon, S. T., and Bartom, E., 2013, Multiplicity of Infection, Brenner's Encyclopedia of Genetics, Elsevier, pp. 509–510.

65. Lu, Z., Breidt, F., Fleming, H. P., Altermann, E., and Klaenhammer, T. R., 2003, Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, Φ JL-1, from a cucumber fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, **84**(2), pp. 225–235.
66. Hong, Y., Pan, Y., and Ebner, P. D., 2014, MEAT SCIENCE AND MUSCLE BIOLOGY SYMPOSIUM: Development of bacteriophage treatments to reduce *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef products and produce¹, *Journal of Animal Science*, **92**(4), pp. 1366–1377.
67. Sinha, S., Grewal, R. K., and Roy, S., 2018, Modeling Bacteria–Phage Interactions and Its Implications for Phage Therapy, *Advances in Applied Microbiology*, *Elsevier*, pp. 103–141.
68. Ackermann, H.-W., 2012, Bacteriophage Electron Microscopy, *Advances in Virus Research*, *Elsevier*, pp. 1–32.
69. Li, C., Yuan, X., Li, N., Wang, J., Yu, S., Zeng, H., Zhang, J., Wu, Q., and Ding, Y., 2020, Isolation and Characterization of *Bacillus cereus* Phage ν B_BceP-DLc1 Reveals the Largest Member of the Φ 29-Like Phages, *Microorganisms*, **8**(11), p. 1750.
70. Hurst, C. J., Gerba, C. P., and Cech, I., 1980, Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil, *Applied and environmental microbiology*, **40**(6), pp. 1067–1079.
71. Olson, M. R., Axler, R. P., and Hicks, R. E., 2004, Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability, *Journal of virological methods*, **122**(2), pp. 147–152.
72. Yates, M. V., Gerba, C. P., and Kelley, L. M., 1985, Virus persistence in groundwater, *Applied and environmental microbiology*, **49**(4), pp. 778–781.
73. Sui, B., Qi, X., Wang, X., Ren, H., Liu, W., and Zhang, C., 2021, Characterization of a Novel Bacteriophage ν swi2 Harboring Two Lysins Can Naturally Lyse *Escherichia coli*, *Frontiers in Microbiology*, **12**.
74. Guinebretiere, M. H., Girardin, H., Dargaignaratz, C., Carlin, F., and Nguyen-The, C., 2003, Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line, *Int J Food Microbiol*, **82**(3), pp. 223–232.
75. Williamson, K. E., Radosevich, M., and Wommack, K. E., 2005, Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils, *Applied and environmental microbiology*, **71**(6), pp. 3119–3125.

76. Oh, H., Seo, D. J., Jeon, S. B., Park, H., Jeong, S., Chun, H. S., Oh, M., and Choi, C., 2017, Isolation and Characterization of *Bacillus cereus* Bacteriophages from Foods and Soil, *Food Environ Virol*, **9**(3), pp. 260–269.
77. Lee, W.-J., Billington, C., Hudson, J. A., and Heinemann, J. A., 2011, Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus cereus*: *Bacillus cereus* phages, *Letters in Applied Microbiology*, **52**(5), pp. 456–464.
78. Roseline, F., Waturangi, D. E., and Y, Y., 2021, ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND APPLICATION OF BACTERIOPHAGES AGAINST SEVERAL FOOD SPOILAGE BACTERIA: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, AND *Shewanella Putrefaciens*, *Bacterial Empire*, **4**(2), pp. e263–e263.
79. Thorne, C. B., 1968, Transducing Bacteriophage for *Bacillus cereus*, *J Virol*, **2**(7), pp. 657–662.
80. Weinbauer, M. G., 2004, Ecology of prokaryotic viruses, *FEMS microbiology reviews*, **28**(2), pp. 127–181.
81. Rovik, A., and PRAMONO, H., 2020, Isolation and selection of *Bacillus cereus* specific phages from hospital wastewater, *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **21**(7).
82. Gdoura-Ben Amor, M., Culot, A., Techer, C., AlReshidi, M., Adnan, M., Jan, S., Baron, F., Grosset, N., Snoussi, M., Gdoura, R., and Gautier, M., 2022, Isolation, Partial Characterization and Application of Bacteriophages in Eradicating Biofilm Formation by *Bacillus cereus* on Stainless Steel Surfaces in Food Processing Facilities, *Pathogens*, **11**(8), p. 872.
83. Aprea, G., D'Angelantonio, D., Boni, A., Connerton, P., Connerton, I., Scattolini, S., Marotta, F., Pomilio, F., Migliorati, G., and D'Alterio, N., 2018, Isolation and morphological characterization of new bacteriophages active against *Campylobacter jejuni*, *Am J Clin Microbiol Antimicrobials*, **1**(1), p. 1004.
84. Surekhamol, I. S., Deepa, G. D., Somnath Pai, S., Sreelakshmi, B., Varghese, S., and Bright Singh, I. S., 2014, Isolation and characterization of broad spectrum bacteriophages lytic to *Vibrio harveyi* from shrimp farms of Kerala, India, *Letters in applied microbiology*, **58**(3), pp. 197–204.

85. Kong, M., Na, H., Ha, N.-C., and Ryu, S., 2019, LysPBC2, a novel endolysin harboring a *Bacillus cereus* spore binding domain, *Applied and environmental microbiology*, **85**(5), pp. e02462-18.
86. El-Arabi, T. F., Griffiths, M. W., She, Y.-M., Villegas, A., Lingohr, E. J., and Kropinski, A. M., 2013, Genome sequence and analysis of a broad-host range lytic bacteriophage that infects the *Bacillus cereus* group, *Virology*, **10**(1), p. 48.
87. Beng, T. T., Shin, T. O., Khang, C. Y., Michelle, Y. T. N., Tau, C. L., and Wen, S. T., 2009, Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen, *African Journal of Biotechnology*, **8**(2), pp. 268–273.
88. Ross, A., Ward, S., and Hyman, P., 2016, More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages, *Front. Microbiol.*, **7**.
89. Ackermann, H.-W., 2003, Bacteriophage observations and evolution, *Research in Microbiology*, **154**(4), pp. 245–251.
90. Shin, H., Bandara, N., Shin, E., Ryu, S., and Kim, K., 2011, Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901, *Research in Microbiology*, **162**(8), pp. 791–797.
91. Shin, H., Bandara, N., Shin, E., Ryu, S., and Kim, K., 2011, Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901, *Research in Microbiology*, **162**(8), pp. 791–797.
92. Shin, H., Lee, J.-H., Park, J., Heu, S., and Ryu, S., 2014, Characterization and genome analysis of the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophages BPS10C and BPS13, *Arch Virol*, **159**(8), pp. 2171–2175.
93. Gillis, A., and Mahillon, J., 2014, Phages Preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: Past, Present and Future, *Viruses*, **6**(7), pp. 2623–2672.
94. Ji, X., Zhang, C., Fang, Y., Zhang, Q., Lin, L., Tang, B., and Wei, Y., 2015, Isolation and characterization of glacier VMY22, a novel lytic cold-active bacteriophage of *Bacillus cereus*, *Virology*, **30**(1), pp. 52–58.
95. Gillis, A., and Mahillon, J., 2014, Prevalence, genetic diversity, and host range of tectiviruses among members of the *Bacillus cereus* group, *Appl Environ Microbiol*, **80**(14), pp. 4138–4152.
96. Ackermann, H.-W., 2009, Phage classification and characterization, *Bacteriophages*, *Springer*, pp. 127–140.

97. Abedon, S. T., 2017, Multiplicity of Infection ☆, *Reference Module in Life Sciences, Elsevier*, p. B9780128096338067000.
98. Silva, Y. J., Costa, L., Pereira, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N. C. M., and Almeida, A., 2014, Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture, *Microbial Biotechnology*, **7**(5), pp. 401–413.
99. Kasman, L. M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M. G., and Norris, J. S., 2002, Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy, *J Virol*, **76**(11), pp. 5557–5564.
100. El-Dougdoug, N. K., Cucic, S., Abdelhamid, A. G., Brovko, L., Kropinski, A. M., Griffiths, M. W., and Anany, H., 2019, Control of Salmonella Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages, *International journal of food microbiology*, **293**, pp. 60–71.
101. Brown, C. M., and Bidle, K. D., 2014, Attenuation of virus production at high multiplicities of infection in *Aureococcus anophagefferens*, *Virology*, **466–467**, pp. 71–81.
102. Sonalika, J., Srujana, A. S., Akhila, D. S., Juliet, M. R., and Santhosh, K. S., 2020, Application of bacteriophages to control Salmonella Enteritidis in raw eggs, *Iran J Vet Res*, **21**(3), pp. 221–225.
103. Ellis, E. L., and Delbruck, M., 1939, The growth of bacteriophage, *The Journal of general physiology*, **22**(3), pp. 365–384.
104. Nguyễn, K. H., Phạm, T. M., and \DJòàn, N. H., 2018, Chu kỳ sống của virus trên san hô ở trạng thái sức khỏe khác nhau tại hang Rái, Ninh Thuận, Việt Nam [Life cycles of coral-associated-viruses related to different health states collected in Hang Rai-Ninh Thuan, Vietnam].
105. Abedon, S. T., Herschler, T. D., and Stopar, D., 2001, Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability, *Appl Environ Microbiol*, **67**(9), pp. 4233–4241.
106. Thorne, C. B., and Holt, S. C., 1974, Cold Lability of *Bacillus cereus* Bacteriophage CP-51, *J Virol*, **14**(4), pp. 1008–1012.
107. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., and Górski, A., 2011, The influence of external factors on bacteriophages—review, *Folia Microbiol*, **56**(3), pp. 191–200.

108. Ackermann, H.-W., Tremblay, D., and Moineau, S., 2004, Long-term bacteriophage preservation.
109. Phongtang, W., and Chukeatirote, E., 2021, Incidence and characterisation of *Bacillus cereus* bacteriophages from Thua Nao, a Thai fermented soybean product, *Biomolecular Concepts*, **12**(1), pp. 85–93.
110. Nakai, T., and Park, S. C., 2002, Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture, *Research in microbiology*, **153**(1), pp. 13–18.
111. Jarrell, K. F., Vydykhan, T., Lee, P., Agnew, M. D., and Thomas, N. A., 1997, Isolation and characterization of bacteriophage BCJA1, a novel temperate bacteriophage active against the alkaliphilic bacterium, *Bacillus clarkii*, *Extremophiles*, **1**(4), pp. 199–206.
112. Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E., and Sulakvelidze, A., 2001, Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study, *Journal of food protection*, **64**(8), pp. 1116–1121.
113. Pandey, S., Chachra, D., Chandra, M., and Saxena, H., 2013, Protein profiling and physico-chemical characterization of an isolated phage against *Brucella abortus* Strain 19, *African journal of microbiology research*, **7**, pp. 1233–1238.
114. González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B., and García, P., 2018, Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products, *PLoS ONE*, **13**(10), p. e0205728.
115. Tallent, S. M., Rhodehamel, E. J., Harmon, S. M., and Bennett, R. W., 1998, *BAM: Bacillus cereus*, *Bacteriological Analytical Manual*. 8th ed. Silver Spring: US Food and Drug Administration.
116. Pasvolsky, R., Zakin, V., Ostrova, I., and Shemesh, M., 2014, Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species, *International Journal of Food Microbiology*, **181**, pp. 19–27.
117. Ahmadi, H., Thermal Stability of Encapsulated *Listeria* Bacteriophage and Its Efficacy Against *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Meats, p. 168.
118. Tidona, F., Zago, M., Carminati, D., and Giraffa, G., 2022, The Reduction of Salt in Different Cheese Categories: Recent Advances and Future Challenges, *Frontiers in Nutrition*, **9**.

119. Seaman, P. F., and Day, M. J., 2007, Isolation and characterization of a bacteriophage with an unusually large genome from the Great Salt Plains National Wildlife Refuge, Oklahoma, USA, *FEMS microbiology ecology*, **60**(1), pp. 1–13.