

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Ngô Thị Huyền Trang

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG
LY GIẢI VI KHUẨN *VIBRIO* SPP. GÂY BỆNH TRÊN
TÔM CỦA THỰC KHUẨN THỂ THU THẬP
TẠI TỈNH QUẢNG NINH**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Ngô Thị Huyền Trang

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG LY
GIẢI VI KHUẨN *VIBRIO* SPP. GÂY BỆNH TRÊN TÔM CỦA
THỰC KHUẨN THỂ THU THẬP TẠI TỈNH QUẢNG NINH**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

TS. Quách Ngọc Tùng 

Hà Nội – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài “Nghiên cứu phân lập và đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của thực khuẩn thể thu thập tại tỉnh Quảng Ninh” trong luận văn này là công trình nghiên cứu trực tiếp của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Quách Ngọc Tùng. 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 toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận văn



Ngô Thị Huyền Trang

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi xin chân thành cảm ơn TS. Quách Ngọc Tùng, là người thầy đã trực tiếp hướng dẫn, định hướng nghiên cứu và tận tình chỉ bảo tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Đồng thời, luận văn được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí một phần của học bổng sau Tiến sĩ cấp bởi Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup, Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn, mã số VINIF.2023.STS.78 cho TS. Quách Ngọc Tùng.

Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo cũng như toàn bộ nhân viên trong Công ty Cổ phần công nghệ thủy sản AVITECH đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và làm việc. Đồng thời, luận văn được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Công ty Cổ phần công nghệ thủy sản AVITECH.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các cán bộ nghiên cứu tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật đã tận tình chỉ bảo và truyền đạt nhiều kinh nghiệm thực tiễn quý giá trong hoạt động nghiên cứu khoa 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 tận tình truyền đạt những kiến thức chuyên ngành quý báu cũng như tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình và tất cả bạn bè đã luôn động viên và tạo mọi điều kiện cho tôi để đạt được kết quả này.

Tác giả luận văn



Ngô Thị Huyền 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 NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. Tình hình dịch bệnh và các tác nhân gây bệnh vibriosis trên tôm.....	3
1.1.1. Tình hình dịch bệnh trên tôm nước lợ.....	3
1.1.2. Các bệnh vibriosis điển hình trên tôm nước lợ.....	4
1.1.3. Đặc điểm phân loại và hình thái của vi khuẩn <i>Vibrio</i>	5
1.1.4. Các biện pháp phòng và trị bệnh gây bởi <i>Vibrio</i> spp.....	7
1.2. Tổng quan về thực khuẩn thể.....	8
1.2.1. Lịch sử nghiên cứu và những ứng dụng của thực khuẩn thể.....	8
1.2.2. Đặc điểm hình thái và phân loại thực khuẩn thể.....	9
1.2.3. Quá trình xâm nhiễm của thực khuẩn thể trong tế bào ký chủ.....	11
1.3. Nghiên cứu thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh gây bởi <i>Vibrio</i> spp. ...	13
1.4. Một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng lây nhiễm của thực khuẩn thể trên ký chủ.....	14
1.5. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	16
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	17
2.1.1. Nguồn mẫu phân lập TKT.....	17
2.1.2. Hóa chất.....	17
2.1.3. Trang thiết bị, dụng cụ.....	17
2.1.4. Môi trường và dung môi.....	17
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn <i>Vibrio</i> spp.....	18
2.2.2. Phương pháp định danh vi khuẩn <i>Vibrio</i> spp.....	18
2.2.3. Phương pháp phân lập và tinh sạch thực khuẩn thể.....	19
2.2.4. Quan sát hình thái thực khuẩn thể.....	20
2.2.5. Xác định tỷ lệ lây nhiễm của thực khuẩn thể.....	20
2.2.6. Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn của thực khuẩn thể C1 <i>in vitro</i>	21
2.2.7. Xây dựng đường cong sinh trưởng của thực khuẩn thể.....	21
2.2.8. Nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến sự ổn định của TKT.....	21

2.2.9. Phương pháp xử lý số liệu.....	22
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	23
3.1. Phân lập và định danh các chủng <i>Vibrio</i> spp. từ mẫu tôm bệnh và nước ao nuôi tôm.....	23
3.1.1. Phân lập <i>Vibrio</i> spp. từ các mẫu nhiễm bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. 23	
3.1.2. Phân loại các chủng <i>Vibrio</i>	25
3.2. Phân lập và sàng lọc thực khuẩn thể có khả năng ly giải <i>Vibrio</i> spp.....	31
3.2.1. Phân lập và tinh sạch thực khuẩn thể có khả năng ly giải <i>Vibrio</i> spp. . 31	
3.2.2. Tuyển chọn thực khuẩn thể có đặc tính ly giải <i>Vibrio</i> tiềm năng.....	33
3.2.3. Nghiên cứu đặc điểm hình thái của thực khuẩn thể.....	34
3.3. Đánh giá đặc tính ly giải vi khuẩn <i>Vibrio</i> của thực khuẩn thể C1	36
3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ lây nhiễm MOI tới khả năng ly giải của thực khuẩn thể C1	36
3.3.2. Đường cong sinh trưởng đơn bậc của TKT C1	40
3.3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự ổn định của thực khuẩn thể C1.....	42
3.3.4. Ảnh hưởng của pH tới sự ổn định của thực khuẩn thể C1.....	43
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	45
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	46
PHỤ LỤC	53

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tên đầy đủ	Tên Tiếng Việt
AHPND	Acute hepatopancreatic necrosis disease	Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính
bp	Base pair	
CFU	Colony forming units	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
DNA	Deoxyribonucleotide acid	
dsDNA	Double strand DNA	DNA sợi đôi
ssDNA	Single strand DNA	DNA sợi đơn
dsRNA	Double strand RNA	RNA sợi đôi
ssRNA	Single strand RNA	RNA sợi đơn
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	
MOI	Multiplicity of infection	Tỷ lệ lây nhiễm
OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
PFU	Plaque forming units	Đơn vị hình thành vết tan
SM	Sodium chloride, Magnesium sulphate	Đệm NaCl-MgSO ₄
TEM	Transmission electron microscopy	Kính hiển vi điện tử truyền qua
TKT	Thực khuẩn thể	
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Ủy ban Quốc tế về Phân loại Virus
BAVS	Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee	Tiểu ban Vi khuẩn và Vi khuẩn cổ
ATCC	American Type Culture Collection	Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật Mỹ
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thông tin các mẫu được thu thập tại tỉnh Quảng Ninh.....	17
Bảng 3.1. Đánh giá mật độ <i>Vibrio</i> từ các mẫu thu thập tại tỉnh Quảng Ninh	25
Bảng 3.2. Hình thái các chủng <i>Vibrio</i> spp. đặc trưng phân lập được.....	26
Bảng 3.3. Kết quả định danh trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn phân lập trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI)	30
Bảng 3.4. Sàng lọc thực khuẩn thể có phổ ly giải <i>Vibrio</i> ký chủ rộng.....	34

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Hình ảnh tế bào của một số loài <i>Vibrio</i> được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua.....	6
Hình 1.2. Hình thái một số thực khuẩn thể theo ICTV	10
Hình 1.3. Chu trình tan và tiềm tan của thực khuẩn thể.....	12
Hình 3.1. Hình ảnh minh họa cho quá trình thu thập mẫu nước (A,B) và tôm bị bệnh (C,D) tại Đông Ngũ, Tiên Yên, Quảng Ninh.....	23
Hình 3.2. Hình ảnh đĩa phân lập các chủng <i>Vibrio</i> trên môi trường TCBS ở 37°C sau 24 giờ. Đĩa phân lập mẫu tôm và nước ao thu nhận tại Đông Ngũ, Tiên Yên (A,B) và Tân Lập, Đầm Hà (C, D).....	24
Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc của 4 chủng <i>Vibrio</i> trên môi trường TCBS....	26
Hình 3.4. Hình thái khuẩn lạc của 3 chủng <i>Vibrio</i> trên môi trường Chromagar	27
Hình 3.5. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA trên gel agarose 1,0%. Chú thích: M, thang DNA chuẩn (Thermo Scientific).....	28
Hình 3.6. Mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn phân lập A1.2, A2, D1 và H3 với các chủng tham chiếu chuẩn.	29
Hình 3.7. Kết quả phân lập TKT bằng phương pháp nhỏ giọt trên môi trường thạch hai lớp có vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> H3 (A) và <i>V. alginolyticus</i> D1 (B) làm ký chủ.....	32
Hình 3.8. Hình ảnh TKT C1 (A) và TKT C2 (B) đã được tinh sạch với <i>V. alginolyticus</i> D1 làm ký chủ	33
Hình 3.9. Hình thái vết tan trên ký chủ <i>V. parahaemolyticus</i> H3 (A) và thực khuẩn thể C1 quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (B,C).....	35
Hình 3.10. Mật độ TKT C1 trên chủng <i>V. parahaemolyticus</i> H3 ở các giá trị MOI khác nhau sau 10 giờ lây nhiễm.....	36
Hình 3.11. Đường cong sinh trưởng biểu diễn hoạt tính ly giải chủng <i>V. parahaemolyticus</i> H3 của thực khuẩn thể C1 ở các MOI khác nhau	37
Hình 3.12. Mật độ TKT C1 trên chủng <i>V. alginolyticus</i> D1 ở các giá trị MOI khác nhau sau 10 giờ lây nhiễm.....	38
Hình 3.13. Đường cong sinh trưởng biểu diễn hoạt tính ly giải chủng <i>V. alginolyticus</i> D1 của thực khuẩn thể C1 ở các MOI khác nhau	39

Hình 3.14. Đường cong sinh trưởng đơn bậc của TKT C1	41
Hình 3.15. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự ổn định của TKT C1	42
Hình 3.16. Ảnh hưởng của pH tới sự ổn định của thực khuẩn thể C1	43

MỞ ĐẦU

Dựa trên vị trí địa lý và tự nhiên ưu đãi, Việt Nam đang đẩy mạnh ngành công nghiệp nuôi trồng và chế biến thủy sản. Kim ngạch xuất khẩu tôm của Việt Nam đã đạt 4,3 tỷ USD năm 2023, tăng 13-14% so với năm 2022. Định hướng đến năm 2025, chế biến xuất khẩu thủy sản tiếp tục là động lực thúc đẩy phát triển nuôi trồng thủy sản, khai thác thủy sản và mang lại nhiều lợi ích kinh tế ngành, nâng cao thu nhập và đời sống lao động nghề tôm. Tuy nhiên, ngành nuôi trồng tôm tiếp tục phải hứng chịu sự xuất hiện của nhiều loại dịch bệnh gây chết hàng loạt. Trong đó, bệnh do vi khuẩn *Vibrio* spp. hay còn gọi là vibriosis là một trong những nguyên nhân gây bệnh chính ở tôm, ước tính gây thiệt hại khoảng 1 tỷ USD mỗi năm trên toàn thế giới. Tiêu biểu, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) do *Vibrio parahaemolyticus* và bệnh phân trắng (White Feces Disease, WFD) do *Vibrio alginolyticus* là một trong những bệnh nguy hiểm xảy ra phổ biến và gây thiệt hại đối với nghề nuôi tôm trong những năm gần đây. Sử dụng kháng sinh để ngăn ngừa và điều trị nhiễm khuẩn *Vibrio* spp. đã được áp dụng ở nhiều nơi, dẫn đến sự xuất hiện các chủng kháng kháng sinh. Do vậy, các giải pháp nuôi trồng tôm không sử dụng kháng sinh mà vẫn đảm bảo năng suất nuôi trồng tôm đã và đang được nghiên cứu, phát triển trên toàn thế giới.

Việc sử dụng các chủng vi khuẩn probiotic có khả năng tạo ra kháng sinh sinh học, cạnh tranh dinh dưỡng với vi khuẩn gây bệnh và nâng cao hệ miễn dịch của tôm đã và đang được sử dụng. Nhược điểm của giải pháp này là thời gian phát triển của vi khuẩn chậm và nhiều vi khuẩn probiotic không thể phát triển ở điều kiện thực tế. Trước bối cảnh đó, thực khuẩn thể (bacteriophage) đã trở thành một giải pháp thay thế đầy hứa hẹn. Nhờ đặc tính ly giải tế bào vi khuẩn chủ, khả năng phát tán và tính đặc hiệu, thực khuẩn thể được sử dụng trong phòng trừ vi khuẩn *Erwinia amylovora* trên cây đào và *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* gây bệnh héo xanh và đốm trên cà chua. Hơn nữa, thực khuẩn thể cũng được chứng minh đặc hiệu và an toàn trong ức chế vi khuẩn *Vibrio* spp. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về phân lập TKT và đánh giá hoạt tính ly giải một cách hệ thống trên các chủng *Vibrio* gây bệnh tại các tỉnh miền Bắc Việt Nam. Chính vì tiềm năng

ngiên cứu và ứng dụng của thực khuẩn thể, đề tài: “**Nghiên cứu phân lập và đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của thực khuẩn thể thu thập tại tỉnh Quảng Ninh**” được thực hiện nhằm tạo ra bộ chủng giống và hướng đến mục tiêu sản xuất chế phẩm thực khuẩn thể nhằm kiểm soát các vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh trên tôm.

Mục đích của đề tài:

Phân lập được vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh trên tôm và thực khuẩn thể có khả năng lây nhiễm và ly giải vi khuẩn *Vibrio* từ các mẫu nước ao nuôi tôm tại tỉnh Quảng Ninh.

Nội dung nghiên cứu:

- (1) Phân lập và định danh các chủng *Vibrio* spp. từ mẫu tôm bệnh và nước ao nuôi tôm.
- (2) Phân lập và sàng lọc thực khuẩn thể có khả năng ly giải các chủng *Vibrio* phân lập được.
- (3) Đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn *Vibrio* của thực khuẩn thể được tuyển chọn.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tình hình dịch bệnh và các tác nhân gây bệnh vibriosis trên tôm

1.1.1. Tình hình dịch bệnh trên tôm nước lợ

Tại Việt Nam, diện tích thả nuôi tôm nước lợ của 6 tháng đầu năm 2023 đạt 656 nghìn ha, tăng 6,4% so với cùng kỳ năm 2022, trong đó tôm sú là 605 nghìn ha, tôm thẻ chân trắng là 51 nghìn ha. Sản lượng tôm các loại nửa đầu năm 2023 ước tính đạt 467 nghìn tấn, tăng 4,1% so với cùng kỳ năm 2022. Trong đó, sản lượng tôm sú 119,3 nghìn tấn, tăng 1,2%, tôm thẻ chân trắng 312,5 nghìn tấn, tăng 5,2%. Kim ngạch xuất khẩu tôm đạt 1,56 tỷ USD, chiếm 38% tổng kim ngạch xuất khẩu thủy sản cả nước [1]. Tuy nhiên, diện tích nuôi tôm nước lợ bị thiệt hại là gần 21.250 ha tại 22 tỉnh, thành phố trong năm 2023, tăng 7,9% so với cùng kỳ năm trước. Thiệt hại chủ yếu được ghi nhận ở các mô hình nuôi tôm quảng canh, quảng canh cải tiến và tôm lúa, nơi mà nguồn nước dễ bị ô nhiễm và chịu nhiều tác động của con người.

Các tác nhân gây bệnh thường là vi rút (hội chứng Taura, vi rút đầu vàng), vi khuẩn (hội chứng chết sớm/ bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, hội chứng phát quang, hội chứng phân trắng), bào tử (bệnh microsporidiosis) và ký sinh trùng (bệnh mang amip). Thiệt hại chủ yếu là do vi khuẩn gây bệnh đốm trắng, hoại tử gan tụy cấp tính, hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan biểu mô và đỏ thân. Các bệnh trên được xác định và thuộc nhóm bệnh vibriosis do vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra. Không chỉ tôm, bệnh này còn gây tử vong hoàn toàn cho nuôi trồng thủy sản biển và động vật có vỏ bị nhiễm bệnh trong các trại giống và ao nuôi thương phẩm [2]. Vibriosis là bệnh gây bởi vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. splendidus* và *V. vulnificus* [3]. Cuối năm 2019, bệnh này được gọi là “bệnh hậu ấu trùng thủy tinh” khiến tỷ lệ tôm chết hàng loạt (khoảng 90%) trong vòng chưa đầy 48 giờ bị nhiễm bệnh tại các trại sản xuất giống tôm ở Trung Quốc [4]. Ngoài yếu tố mầm bệnh, các yếu tố môi trường như thay đổi độ mặn, nhiệt độ và oxy hòa tan thấp trong nước ao nuôi tôm có thể khiến vi khuẩn nhân lên nhanh chóng trong máu tôm, từ đó gây bùng phát dịch [5].

Bệnh vibriosis không chỉ gây thiệt hại lớn với ngành nuôi tôm thế giới mà còn gây thiệt hại lớn cho ngành nuôi tôm ở Việt Nam. Tôm nuôi bị các

bệnh phổ biến như hoại tử gan tụy cấp tính, bệnh phân trắng, bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan biểu mô, bệnh do vi bào tử trùng, hội chứng phân trắng. Năm 2022, tổng diện tích nuôi tôm bị thiệt hại là trên 23,4 nghìn ha, tăng 15,5% so với năm 2021. Trong năm 2022, tổng diện tích tôm nước lợ xác định được do dịch bệnh là trên 7,1 nghìn ha, chiếm 30,4% diện tích tôm bị thiệt hại. Theo số liệu đầu năm 2023, cả nước có trên 1,6 nghìn ha tôm nuôi tại 6 tỉnh bị thiệt hại với tổng diện tích xác định được bệnh là khoảng 688 ha, chiếm 42,7% tổng diện tích tôm thiệt hại chủ yếu tại tỉnh Cà Mau, Bạc Liêu, Trà Vinh và các địa phương khác.

1.1.2. Các bệnh vibriosis điển hình trên tôm nước lợ

1.1.2.1. Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) trước đây gọi là hội chứng tôm chết sớm là một bệnh nghiêm trọng trên tôm do *V. parahaemolyticus* gây ra. AHPND được báo cáo lần đầu tiên ở Trung Quốc vào năm 2009, sau đó được báo cáo ở các nước Châu Á khác (Bangladesh, Trung Quốc, Malaysia, Philippines, Thái Lan và Việt Nam), Bắc Mỹ (Mexico và Hoa Kỳ) và Trung Mỹ (Costa Rica) [6]. Bệnh AHPND đã được Tổ chức Thú y Thế giới liệt kê là bệnh nguy hiểm đối với tôm vào năm 2017. Bệnh gây chết hàng loạt đến 100% trong vòng 30–35 ngày sau khi thả hậu ấu trùng vào ao nuôi tôm, gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi trồng thủy sản toàn cầu trong thập kỷ qua do bệnh lý diễn ra nhanh chóng, nguyên nhân phức tạp và đặc điểm lan rộng của bệnh. Ngoài ra, các chủng *V. owensii*, *V. campbelli*, *V. harveyi*, *V. punensis* cũng gây ra bệnh này nhưng chiếm ở mức thấp. Tác nhân gây bệnh được xác định là hai loại độc tố giống Pir là PirA và PirB được mã hóa bởi một plasmid [7]. Hai loài tôm *Penaeus vannamei* và *Penaeus monodon* đã được chứng minh là dễ nhiễm bệnh này.

Các dấu hiệu lâm sàng có thể nhìn thấy bao gồm chán ăn, chậm lớn, lơ đờ, bơi lội thất thường, gan tụy nhợt nhạt đến trắng, đường tiêu hóa rỗng, vỏ mềm và các đốm hắc tố trong gan tụy. Đường tiêu hóa bên trong của vật chủ (đặc biệt là ruột giữa trước, manh tràng, dạ dày và gan tụy) bị ảnh hưởng bởi các chủng vi khuẩn gây bệnh, làm ảnh hưởng đến phản ứng phòng vệ toàn diện [8]. Phân tích mô học của gan tụy cho thấy các tế bào biểu mô bị bong tróc, hoại tử biểu mô ống và thâm nhiễm tế bào máu. Các quá trình viêm và

sự hình thành hắc tố của mô ống cũng có thể được quan sát thấy bằng phương pháp chụp cắt mặt của tế bào gan tụy. Sự xâm nhập của *Vibrio* bắt đầu trong dạ dày tôm và sau đó lan đến vùng thượng thận nơi chất độc được giải phóng [9].

1.1.2.2. Bệnh phân trắng

Bệnh phân trắng (White feces disease, WFD) thường được phát hiện khi quan sát thấy các chuỗi phân màu trắng nổi trên mặt ao và tôm đột ngột giảm lượng ăn, tôm chậm lớn hoặc chết nếu không điều trị kịp thời, gây thiệt hại kinh tế lớn cho các trang trại nuôi tôm [10]. Bệnh có các biểu hiện đặc trưng là phân lỏng, đường ruột có màu vàng nâu chuyển dần sang màu trắng sữa. Bệnh phân trắng hiện chưa rõ nguyên nhân thực sự nhưng vi khuẩn *Vibrio* spp. là tác nhân thường gặp với tỉ lệ nhiễm trên 40% trên tôm nhiễm bệnh phân trắng. Trương Minh Út và cộng sự (2021) đã cảm nhiễm tôm với hai tổ hợp vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* và *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* cho thấy tôm có các dấu hiệu bệnh lý đường ruột như phân lỏng và màu trắng sữa đặc trưng tương tự như tôm thẻ chân trắng bị bệnh phân trắng thu từ ao nuôi [11]. Khi hệ thống miễn dịch yếu, tôm cũng bị nhiễm động vật nguyên sinh gây ra hiện tượng vỏ màu sẫm [12]. Bệnh này đã được báo cáo từ ngành nuôi tôm sú (*P. monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*P. vannamei*) ở một số nước châu Á như Thái Lan, Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia. Quan sát mô ruột cho thấy thành ruột mỏng kết hợp với sự bong ra của các tế bào biểu mô ruột và sự giảm hoặc biến mất của vi nhung mao. Mô bệnh học của tôm bị bệnh phân trắng cũng cho thấy những tổn thương đáng chú ý ở gan tụy [13].

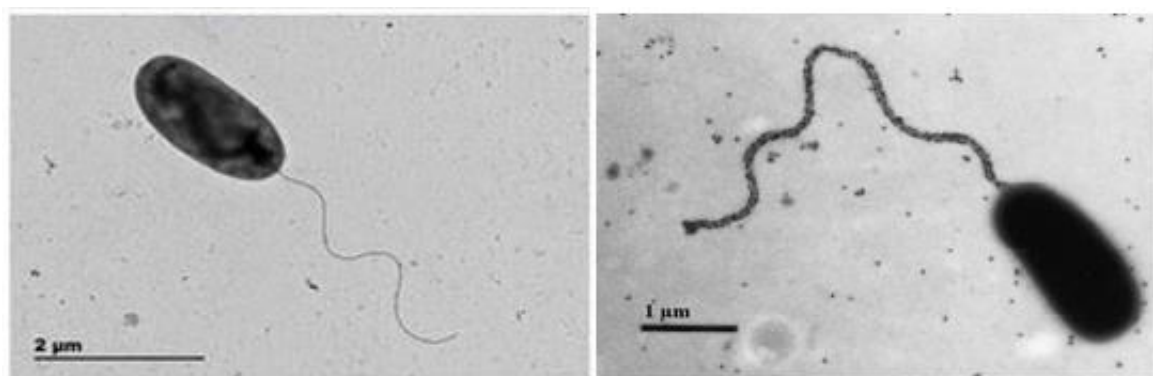
1.1.3. Đặc điểm phân loại và hình thái của vi khuẩn *Vibrio*

Thuật ngữ “*Vibrio*” xuất phát từ tiếng Latin “vibrate” [14]. Các tài liệu sớm nhất về một bệnh nhiễm trùng *Vibrio* có trước kỷ nguyên Kitô giáo trong thế kỷ thứ 5 trước Công nguyên. Bác sĩ Hippocrates đã mô tả bệnh nhiễm trùng tụ máu cấp tính trên bệnh nhân Cronon và đặt ra giả thuyết rằng bệnh nhân đã bị nhiễm trùng *Vibrio vulnificus*. Năm 1854, Filippo Pacini đã phân lập được *Vibrio cholerae* bằng kính hiển vi và đề xuất dịch tả là một căn bệnh

truyền nhiễm [15]. Tới nay, chi *Vibrio* đã được phân loại theo hệ thống phân loại quốc tế với sự có mặt của 147 loài [16].

- Giới Bacteria
 - Ngành (Phylum) Proteobacteria
 - Lớp (Class) Gammaproteobacteria
 - Bộ (Order) Vibrionales
 - Họ (Family) Vibrionaceae
 - Chi (Genus) *Vibrio*

Về đặc điểm sinh học, vi khuẩn *Vibrio* spp. là các tế bào Gram âm, có dạng hình que thẳng hoặc hơi uốn cong, có kích thước $0,3-0,5 \mu\text{m} \times 1,4-2,6 \mu\text{m}$, không hình thành bào tử. Chúng chuyển động nhờ một tiêm mao hoặc nhiều tiêm mao mảnh. Hầu hết *Vibrio* spp. có khả năng sinh oxidase và catalase, đồng thời lên men glucose mà không tạo ra khí [14]. Các loài vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* đều yếm khí tùy tiện, có khả năng oxy hóa và lên men trong môi trường O/F glucose, không có khả năng sinh H_2S và mẫn cảm với vibriostat. *Vibrio* sinh trưởng tốt trong điều kiện hiếu khí, phát triển chậm ở điều kiện kỵ khí và hiếu khí yếu.



V. alginolyticus

V. parahaemolyticus

Nguồn: Buller, 2004

Hình 1.1. Hình ảnh tế bào của một số loài *Vibrio* được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua

Môi trường nuôi cấy các loài vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* cần muối NaCl cho sự tăng trưởng và phát triển. Nồng độ muối cần thiết trong môi trường nuôi cấy là 1-2%, ở nồng độ cao (6% trở lên) *Vibrio* có khả năng bị ức chế.

Chúng cũng sinh trưởng tốt hơn trong môi trường kiềm với pH trong khoảng 6,4-9,6, pH tối ưu ở 8,2 [17]. Các loài *Vibrio* có thể được tìm thấy trong phần lớn môi trường biển, từ sông, cửa sông, biển đến vùng biển sâu. *Vibrio* là vi khuẩn đặc trưng ở các vùng nước biển ấm, phát triển mạnh ở nhiệt độ 16-40°C, tối ưu ở 37°C [18]. Đặc biệt, mật độ vi khuẩn tăng trong những tháng mùa hè khi nhiệt độ ấm hơn và lượng mưa giảm [19]. Chi *Vibrio* được liên kết với một loạt các động vật thủy sinh như cá, động vật giáp xác và động vật thân mềm [3]. *Vibrio* cũng có mặt trong các tầng nước và tạo thành một phần của màng sinh học trên các bề mặt ngập nước. Những vi khuẩn này cũng có thể được tìm thấy ở động vật khỏe mạnh, hệ thống nuôi trồng thủy sản và mô động vật. Chúng thường không gây bệnh và tạo thành một phần của quần thể vi sinh vật tự nhiên [20].

1.1.4. Các biện pháp phòng và trị bệnh gây bởi *Vibrio* spp.

Giống như các dịch bệnh trên tôm khác, việc kiểm soát và phòng ngừa vibriosis đòi hỏi an toàn sinh học để cải thiện điều kiện vệ sinh trại giống, sử dụng tôm giống chất lượng cao, quản lý tôm bố mẹ sạch mầm bệnh và duy trì mật độ thả thích hợp [21]. Nhìn chung, kháng sinh được sử dụng để điều trị các bệnh do vi khuẩn gây ra nhưng việc lạm dụng kháng sinh bừa bãi có thể dẫn đến tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn đe dọa con người. Vì vậy, cần có những biện pháp phòng và điều trị thích hợp để kiểm soát bệnh do vi khuẩn, ngăn ngừa vi khuẩn kháng thuốc. Việc phòng ngừa và phát hiện sớm *V. parahaemolyticus* ở các trang trại nuôi tôm có thể ngăn chặn sự xuất hiện của vibriosis. Một số biện pháp sinh học ngăn ngừa và điều trị bệnh vibriosis trên tôm như sau [22]:

Probiotic: Các chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn sống được bổ sung nhằm cải thiện chất lượng nước hoặc ngăn ngừa bệnh tật. Các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm đạt được những kết quả tích cực nhưng thiếu các thử nghiệm thực địa ở các trang trại thương mại. *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat là một số chế phẩm sinh học thường được sử dụng trong nuôi tôm [23]. Tuy nhiên, tác động của probiotic chậm và một số chủng vi khuẩn không thể phát triển ở môi trường ao nuôi tôm bản địa.

Kháng sinh từ thảo dược: Các loại thảo mộc đóng vai trò như chất kháng sinh để kiểm soát hoặc giảm sự lây nhiễm của mầm bệnh trong ngành nuôi trồng thủy sản và cũng làm tăng tỷ lệ sống sót của sinh vật trong quá trình quản lý dịch bệnh bùng phát. Phần lớn các loại thảo dược có tác dụng chống mầm bệnh, kháng sinh để tăng cường hệ thống miễn dịch của sinh vật, ngăn ngừa bệnh tật hoặc hình thành các giống kháng bệnh trong nuôi trồng thủy sản [23].

Liệu pháp thực khuẩn thể: Bên cạnh việc dễ sử dụng, tác dụng tương đối nhanh và không tốn kém để phân lập từ tự nhiên, thực khuẩn thể (TKT) không lây nhiễm tế bào nhân chuẩn nên không gây hại trực tiếp cho động vật nuôi, động vật hoang dã hoặc con người. Tính đặc hiệu cao của các thực khuẩn thể đối với vi khuẩn mục tiêu, mặc dù các thực khuẩn thể ở biển có thể lây nhiễm các chủng khác nhau của cùng một loài vi khuẩn hoặc các loài có quan hệ họ hàng gần. Sự sao chép của thực khuẩn thể là tự giới hạn và phụ thuộc vào quần thể vật chủ vi khuẩn nên có thể suy giảm theo thời gian [24]. Một số sản phẩm TKT thương mại ứng dụng trong nông nghiệp, chăn nuôi, thực phẩm và y tế đã được FDA phê duyệt sử dụng như Biolyse® BP, AgriPhage™, Ecolicide®, PhageGuard E™, ShigActive™ [25].

1.2. Tổng quan về thực khuẩn thể

1.2.1. Lịch sử nghiên cứu và những ứng dụng của thực khuẩn thể

Năm 1896, nhà vi khuẩn học người Anh Ernest Hanbury Hankin đã công bố những quan sát của mình trong biên niên sử của Viện Pasteur, đó là bằng chứng đầu tiên về sự hiện diện của TKT trong nước sông Ấn và hoạt tính kháng khuẩn của chúng. Nó là một tác nhân giống vi rút với đặc tính diệt khuẩn tức thì, nhạy cảm với nhiệt độ, có khả năng đi qua màng lọc vi khuẩn và làm giảm hiệu giá của vi khuẩn *V. cholerae* trong môi trường nuôi cấy trong phòng thí nghiệm [26]. Năm 1915, Frederick Twort đã công bố trên Tạp chí The Lancet về sự ly giải vi khuẩn *S. aureus*, đây là ấn phẩm đầu tiên về TKT. Năm 1917, d'Herelle đã phân lập được TKT đầu tiên từ phân của bệnh nhân mắc bệnh lỵ và đã phát triển ý tưởng về “liệu pháp TKT” như là cách sử dụng để phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh truyền nhiễm gây bởi vi khuẩn nhưng vẫn hoàn toàn vô hại đối với tế bào chủ [27]. TKT được sử dụng trong

y học từ năm 1919, mười năm trước khi phát hiện ra kháng sinh đầu tiên penicillin.

Năm 1923, Viện TKT quốc tế được thành lập tại Tbilisi, Georgia. Từ những năm 1950 đến nay, TKT được sử dụng như là các công cụ cho các nghiên cứu về sinh học phân tử. Năm 1951, TKT λ được phân lập lần đầu tiên. Từ năm 1977 đến nay, các nghiên cứu tập trung vào phân loại TKT. Năm 2001, Fischetti và cộng sự đã chứng minh được hoạt tính *in vivo* của TKT lysin. Năm 2006, FDA chấp thuận sử dụng hỗn hợp TKT trong thịt ăn liền để ngăn chặn nhiễm *Listeria* [28]. Tuy nhiên, TKT chưa được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi do thiếu những thông tin di truyền cơ bản từ hệ gen của chúng và những cảnh báo về sự phát tán ngoài môi trường.

TKT đã được áp dụng như một phương pháp kiểm soát sinh học nhằm ngăn ngừa các bệnh hại trên cây trồng gây bởi vi khuẩn như *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Pectobacter* spp., *Ralstonia* spp., *Clavibacter michiganensis* và *Agrobacteria tumefaciens* [29]. Tại Hoa Kỳ, các sản phẩm được FDA chấp thuận để sử dụng trong nông nghiệp như sản phẩm AgriPhage đã cho thấy kết quả tích cực trong việc kiểm soát sinh học bệnh đốm tiêu và bệnh thối cà chua [30]. Bổ sung TKT thương mại có khả năng ly giải *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus* và *C. perfringens* vào thức ăn chăn nuôi lợn giúp nâng cao năng suất và sức khỏe đường ruột của lợn [31]. TKT cố định trên màng cellulose điện tích dương hiệu quả trong phòng trừ vi khuẩn *L. monocytogenes* và *E. coli* trong thực phẩm ăn liền [32]. Những kết quả đã được nghiên cứu gần đây đã cho thấy tiềm năng của thực khuẩn thể như là tác nhân kiểm soát sinh học và hoàn toàn có thể ứng dụng trong lĩnh vực nông nghiệp, công nghệ thực phẩm, y dược, xử lý môi trường và chăn nuôi thủy sản.

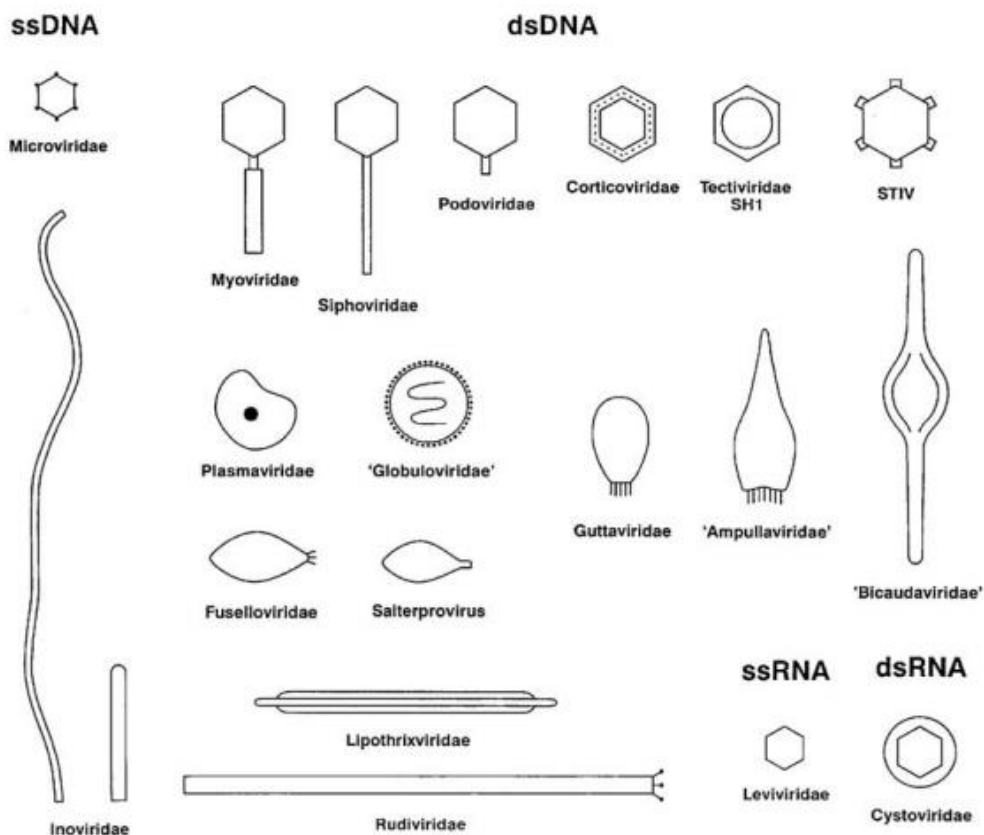
1.2.2. Đặc điểm hình thái và phân loại thực khuẩn thể

TKT thuộc dạng vi rút ký sinh đặc hiệu tế bào vi khuẩn, có cấu trúc gồm lõi là DNA hoặc RNA và được bao bọc bởi vỏ protein. Vật liệu di truyền này được đóng gói thành một vỏ capsid định hình thành các dạng khác nhau. TKT có kích thước trong khoảng 24 - 200 nm, vì vậy TKT chỉ quan sát được qua kính hiển vi điện tử truyền qua [33]. TKT cũng như các vi rút khác có đặc tính ký sinh bắt buộc, không có khả năng tự sinh sản mà phải thông qua tế bào

vật chủ để nhân lên do TKT không có bộ máy tổng hợp năng lượng cũng như không có ribosome để tổng hợp protein [34].

Thực khuẩn thể được phân loại bởi Tiểu ban Vi khuẩn và Vi sinh vật cổ (Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee, BAVS) thuộc Ủy ban Quốc tế về Phân loại vi rút (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) dựa trên nhiều đặc tính của TKT, bao gồm thành phần phân tử của bộ gen (ss/ds, DNA hoặc RNA), hình thái học, cấu trúc của vỏ bọc và phạm vi vật chủ [35]. ICTV đã phân loại TKT gồm 4 bộ, 47 họ, 98 phân họ, 1199 chi, 3601 loài (<https://ictv.global/taxonomy>).

TKT có hình thái như dạng đa diện (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* và *Cystoviridae*), dạng sợi (*Inoviridae*), dạng đa hình hay bất định (*Plasmaviridae*) hoặc có đuôi (*Caudovirales*) [35]. Phần lớn các TKT có đuôi và bộ gen dsDNA (chiếm 96%) thuộc bộ *Caudovirales*, bao gồm 5 họ: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Ackermannviridae* và *Herelleviridae* (Hình 1.2).



Nguồn: Ackermann, 2009

Hình 1.2. Hình thái một số thực khuẩn thể theo ICTV

Hầu hết các TKT có đuôi (khoảng 75%) có cấu trúc dạng đa diện 20 mặt, có kích thước đầu với đường kính từ 45- 185 nm và khoảng 15% có cấu trúc đa diện kéo dài thẳng hàng với trục của đuôi. Trong đó, ba họ TKT có đuôi phổ biến nhất bao gồm:

- a) Họ *Siphoviridae* đuôi dài không co đuôi
- b) Họ *Myoviridae* có đuôi dài co đuôi
- c) Họ *Podoviridae* đuôi ngắn

Ngoài ra, các TKT dạng đa diện, dạng sợi và dạng bất định chiếm tỉ lệ nhỏ (3,7%) [33]. Về hình thái, TKT được chia thành 3 dạng chính, gồm:

- *TKT dạng đa diện (Polyhedral phage)*: Các TKT không đuôi và được phân loại thành 10 họ nhỏ như *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Microviridae*, ...

- *Thể thực khuẩn dạng sợi (Filamentous phage)*: TKT có hình thái dạng sợi dài, mỏng, chứa bộ gen DNA chuỗi đơn hoặc dạng vòng tùy theo từng họ. Chúng có đường kính khoảng 7 nm và chiều dài từ 800 nm- 4 μ m. Bộ gen của chúng có chiều dài từ 4 đến 9 kb [36].

- *Các TKT dạng đa hình hay bất định (Pleomorphic phage)*: Chúng có bộ gen bao gồm một phân tử DNA sợi đôi siêu xoắn, hình vòng, có kích thước khoảng 12 kb. Chúng có virion đa hình thái với đường kính 50-125 nm [37]

1.2.3. Quá trình xâm nhiễm của thực khuẩn thể trong tế bào ký chủ

TKT sinh sản bằng cách lây nhiễm vào tế bào chủ. Dựa vào đặc điểm kí sinh, TKT được chia làm 2 nhóm chính: TKT độc (virulent phage) khi kí sinh theo chu trình sinh tan (lytic cycle) và TKT ôn hòa (temperate phage hay avirulent phage) khi kí sinh không giết tế bào ký chủ, nhưng dưới những kích thích từ môi trường sẽ chuyển sang chu trình tan (lytic cycle) và giết tế bào ký chủ [34].

Quá trình xâm nhiễm bắt đầu bằng sự hấp phụ của TKT lên bề mặt tế bào vi khuẩn bởi sợi đuôi với một thụ thể chuyên biệt trên bề mặt tế bào. Sau đó, TKT đưa vật liệu di truyền từ ống đuôi vào tế bào chất của vật chủ. Sau đó, các quá trình tiếp theo sẽ theo một trong hai chu trình sau:

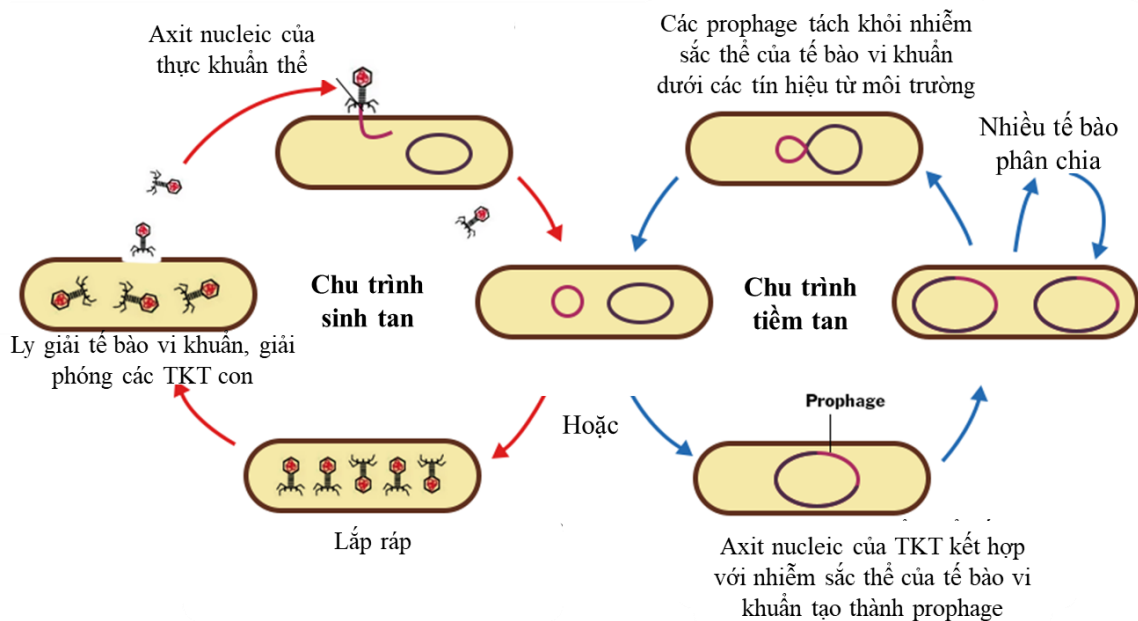
1.2.3.1. Chu trình sinh tan

Bộ gen của TKT ngay lập tức điều chỉnh phần lớn các quá trình trao đổi chất của tế bào vật chủ, vật liệu di truyền của TKT được sao chép và đồng

thời tổng hợp các thành phần cần thiết cho việc hình thành TKT mới. Sau khi các thành phần được tích lũy đầy đủ trong tế bào ký chủ, các thành phần này sẽ tiến hành lắp ráp thành các TKT trưởng thành. Màng tế bào bị ly giải và giải phóng các TKT thế hệ con sẵn sàng cho quá trình xâm nhiễm tiếp theo [38].

1.2.3.2. Chu trình tiềm tan

Bộ gen của TKT sau đó có thể được tích hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn và được sao chép, chuyển giao cho các tế bào vi khuẩn con cháu mà không làm ly giải tế bào chủ. Bộ gen của vi khuẩn tích hợp được gọi là prophage. Các prophage có thể quay trở lại chu trình sao chép nguyên phân dẫn đến sự ly giải vật chủ để đáp ứng với các điều kiện môi trường thay đổi [39].



Nguồn: Niels và cộng sự, 2017

Hình 1.3. Chu trình tan và tiềm tan của thực khuẩn thể

1.2.3.3. Một số chu trình khác

Chu trình giả tiềm tan là giai đoạn phát triển bị đình trệ của một TKT trong tế bào chủ. TKT xâm nhập vào tế bào nhưng không sao chép trong tế bào và không tích hợp ổn định với bộ gen của vật chủ, giúp bảo tồn bộ gen của TKT khi tế bào chủ gặp điều kiện phát triển không thuận lợi như thiếu dinh dưỡng. Khi thay đổi các điều kiện kích thích, TKT thường đi vào chu

trình tan hoặc tiềm tan [40]. Sự xâm nhiễm kéo dài đã được mô tả ở một số TKT dạng sợi, 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.

1.3. Nghiên cứu thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh gây bởi *Vibrio* spp.

TKT thu hút được nhiều sự quan tâm trong nuôi trồng thủy sản nhằm kiểm soát bệnh gây ra bởi các loài vi khuẩn trong những năm gần đây. TKT được sử dụng lần đầu như một liệu pháp kiểm soát sinh học trong thủy sản bởi Wu và cộng sự [41]. Nhóm tác giả đã sử dụng TKT AH1 nhằm kiểm soát sinh học bệnh trên cá gây ra bởi chủng *A. hydrophila*. Kết quả cho thấy TKT kiểm soát tốt vi khuẩn gây bệnh tại tỉ lệ lây nhiễm (MOI) là 0,001. Năm 2013, Higuera và cộng sự đã phân lập được thực khuẩn thể từ các động vật vỏ cứng tại chợ trung tâm ở Santiago có khả năng kiểm soát *V. anguillarum* được phân lập tại trang trại nuôi cá ở Chile, giúp tăng tỉ lệ sống sót của cá hồi (*Salmo satar*) lên đến 100% ở giá trị MOI là 1 và 20 [42]. Kalatzis và cộng sự (2016) đã phân lập hai chủng TKT ϕ St2 và ϕ Grn1 từ mẫu nước bờ biển phía bắc Crete, Hy Lạp có khả năng giảm mật độ vi khuẩn *V. alginolyticus* trên cá tráp lên đến 93% [43].

Bên cạnh đó, cũng có nhiều nghiên cứu về TKT có khả năng nâng cao tỉ lệ sống sót trên tôm. Trên loài tôm *Penaeus monodon*, các nghiên cứu vi mô với ấu trùng bị nhiễm *V. harveyi* cho thấy thực khuẩn thể làm tăng khả năng sống sót của ấu trùng (tăng 55%) khi điều trị bằng thực khuẩn thể so với đối chứng [44]. Năm 2006, nghiên cứu của Vinod và cộng sự cho thấy tôm có tỷ lệ sống cao hơn 46% so với điều trị bằng kháng sinh sau khi bị nhiễm *V. harveyi* tự nhiên. Karunasagar và cộng sự (2007) cũng cho thấy tỷ lệ tôm sống sót cao hơn 20% khi điều trị bằng TKT so với nhóm sử dụng kháng sinh, trong khi đó, Zhang và cộng sự (2015) cũng không tìm thấy sự khác biệt thống kê nào về tỷ lệ sống sót của hải sâm bị nhiễm *V. alginolyticus* sau khi điều trị bằng hỗn hợp thực khuẩn thể so với nhóm được điều trị bằng kháng sinh [44-46]. Năm 2017, Stalin và Srinivasan đã nghiên cứu ấu trùng bị nhiễm *V. harveyi* (10^5 CFU/mL) cho thấy tỉ lệ chết của ấu trùng giảm 43% sau 96 giờ khi điều trị bằng thực khuẩn thể ở 10^9 pfu/mL so với đối chứng [47]. Tôm bị nhiễm *V. paraheamolyticus* được cho ăn hỗn hợp TKT cho tỷ lệ sống sót lên đến 70% sau 144 giờ và tỉ lệ chết là 20% [48].

Trên loài tôm thẻ chân trắng (*L.vannamei*), nghiên cứu của Lomelí-Ortega và Martínez-Díaz (2014) cho thấy tôm được điều trị bệnh do *V. paraheamolyticus* gây ra bằng TKT A3S có tỉ lệ sống sót lên đến 75% ở MOI 0,1 [49]. Năm 2018, nghiên cứu của Jun và cộng sự cho thấy tỷ lệ tử vong tích lũy là 50% sau khi cho ăn thức ăn được bổ sung TKT *Siphoviridae* pVp-1 phân lập ở nước ven biển Hàn Quốc, cao hơn gấp đôi so với mẫu đối chứng với tỷ lệ chết là 100% [50]. Năm 2020, Ding và cộng sự cũng chứng minh hiệu quả điều trị tôm gây nhiễm *V. paraheamolyticus* bằng TKT PG07 được phân lập tại trang trại nuôi tôm ở Thanh Đảo, Trung Quốc khi tỉ lệ chết giảm xuống còn 20-50% sau 72 giờ [51]. Nhìn chung, TKT không những cho hiệu quả tốt trong kiểm soát nhiễm bệnh trong nuôi trồng thủy sản mà còn có hiệu quả cao hơn so với sử dụng kháng sinh.

1.4. Một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng lây nhiễm của thực khuẩn thể trên ký chủ

Hiệu quả của việc ứng dụng TKT trong việc chống lại vi khuẩn gây bệnh phụ thuộc vào một số yếu tố như tỷ lệ TKT/vi khuẩn, các yếu tố hóa lý (pH, nhiệt độ,...), sự trung hòa của thể thực khuẩn hoặc khả năng kháng lại thể thực khuẩn. Hơn nữa, kết quả *in vitro* không thể được áp dụng trực tiếp vào thực nghiệm *in vivo* và kết quả *in vivo* cho một loại TKT này cũng không thể được chuyển sang một TKT khác [52]. Các thông số quan trọng ảnh hưởng đến đặc tính lây nhiễm của TKT bao gồm TKT/vi khuẩn, nhiệt độ và pH.

Tỉ lệ TKT/vi khuẩn

Tỉ lệ lây nhiễm TKT (MOI) là tỷ lệ các tác nhân được hấp phụ, gắn hoặc lây nhiễm với các mục tiêu nhạy cảm. Tỷ lệ này sẽ thay đổi theo hàm số của số lượng tác nhân lây nhiễm, tốc độ bám dính của các tác nhân đó, thời gian cho phép để gắn kết và số lượng mục tiêu để gắn vào [53].

Việc sử dụng TKT kiểm soát vi khuẩn gây bệnh đã được áp dụng theo hai phương pháp khác nhau là phương pháp thụ động và chủ động. Trong phương pháp thụ động, các TKT được bổ sung ở mức đủ để đảm bảo rằng tất cả vi khuẩn mục tiêu đều bị nhiễm bệnh và bị tiêu diệt trong một khoảng thời gian ngắn. Thuật ngữ MOI chỉ được sử dụng trong quá trình lây nhiễm ở môi trường lỏng với số lượng tế bào chủ cao. Trong các thí nghiệm *in vitro* và *in*

vivo trên TKT ly giải vi khuẩn, giá trị MOI từ 0,01 đến 100 được sử dụng phổ biến [52]. Thông thường, MOI là 100 để đảm bảo có đủ TKT trong môi trường. Tuy nhiên, không phải tất cả các TKT đều sao chép hoặc tồn tại theo cách giống nhau. Ví dụ, TKT vB_VpaP_GHSM17 phân lập từ nước thải chợ hải sản có tỷ lệ lây nhiễm cao nhất trên *V. paraheamolyticus* với giá trị MOI là 0,1 [54]. Tương tự, *V. paraheamolyticus* bị ly giải nhanh nhất bởi 2 chủng vB_VpS_BA3 và vB_VpS_CA8 khi giá trị MOI đạt 0,1 được sử dụng [55]. Trái ngược, TKT Vp22 thuộc họ *Podoviridae* đặc hiệu với *V. paraheamolyticus* khi giá trị MOI sử dụng là 0,001, tương ứng với mật độ TKT là 9,52 log PFU/mL [56]. Do vậy, cần lựa chọn TKT với tính đặc hiệu cao với vi khuẩn chủ để đảm bảo hiệu quả sử dụng và kinh tế.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ đóng một vai trò quan trọng trong sự sống sót của TKT. Tốc độ phát triển, khả năng tồn tại và khả năng lây nhiễm của TKT đều bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ. TKT có thể phát triển mạnh ở suối nước nóng, môi trường sống không phổ biến với nhiệt độ dao động từ 40 đến 90°C. Hơn 75% thực khuẩn thể vẫn tồn tại ngay cả sau khi ủ trên băng ở nhiệt độ khoảng 0°C nhưng dễ bị ảnh hưởng ở nhiệt độ cao hơn như 68-70%. Thông số quan trọng nhất liên quan đến việc xác định hoạt động của TKT là nhiệt độ bảo quản. Trong nghiên cứu của Tan và cộng sự (2021), TKT Vp21 và Vp22 có thể ly giải *V. paraheamolyticus* tốt ở khoảng nhiệt độ -20- 60°C trong thời gian dài, tỉ lệ sống sót hơn 95%. TKT Vp21 ly giải tốt nhất ở 25°C và 50°C cho tỉ lệ sống sót lần lượt là 100% và 99,27%. Trong khi đó, TKT Vp22 cho hoạt tính ly giải tốt nhất ở 37-50°C, đạt trên 97% [56]. TKT PVA23 phân lập từ nước thải có khả năng ly giải tốt *V. alginolyticus* khá ổn định ở nhiệt độ dưới 60°C nhưng bị bất hoạt hoàn toàn ở nhiệt độ 70°C [57].

Ảnh hưởng của pH môi trường

Một yếu tố quan trọng khác ảnh hưởng đến hoạt tính của TKT là tính axit của môi trường. Theo Lu và cộng sự (2003), TKT có thể phát triển trong môi trường axit như trong dưa cải bắp với pH 3,5. Độ pH tối ưu cho sự ổn định vật lý của TKT khi bảo quản lâu là từ 6 đến 8. TKT nói chung ổn định ở khoảng pH từ 5–9. TKT có thể bị kết tủa ở môi trường có pH thấp, một số khác bị mất hoạt tính lây nhiễm [58]. Ví dụ, 6 TKT phân lập từ các mẫu hải sản có hoạt tính ổn định ở độ pH cao (pH= 11), hoạt tính ly giải và mật độ

sống sót gần như không thay đổi (100%) và bị bất hoạt ở pH thấp (pH<3). Trong đó, TKT Vp33 có hoạt tính ly giải *V. alginolyticus* gần như không thay đổi trong khoảng pH từ 3-11. Ở pH =2, không có thể thực khuẩn nào sống sót và phục hồi sau thời gian ủ 2 giờ [56]. Trong nghiên cứu khác, TKT MGD2 phân lập từ nghêu (*M. meretrix*) có khả năng ly giải *V. paraheamolyticus* đa kháng thuốc vẫn giữ được khả năng lây nhiễm tối đa sau khi ủ ở các giá trị pH nằm trong khoảng từ 3 đến 10. Tuy nhiên, ở pH 11 mật độ TKT giảm 4,8 log PFU/mL và bất hoạt hoàn toàn ở pH 2 hoặc pH 12 trong 1 giờ [59].

1.5. Tình hình nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, có một số nghiên cứu về khả năng ức chế *Vibrio* của thực khuẩn thể trong nuôi tôm. Năm 2019, nhóm nghiên cứu tại Đại học Cần Thơ đã phân lập được 22 dòng TKT từ nước ao nuôi tôm tại Bạc Liêu và các dòng này đều có khả năng làm giảm số lượng vi khuẩn *Vibrio* spp. tới 90,12% sau 72 giờ trong điều kiện phòng thí nghiệm. Nhóm nghiên cứu của Trương Thị Bích Vân đã nghiên cứu TKT điều trị bệnh do *V. paraheamolyticus* gây ra trên tôm thẻ chân trắng. Kết quả cho thấy, mật độ vi khuẩn trong nước và trong gan tụy tôm giảm mạnh lần lượt là từ $4,6 \times 10^4$ CFU/mL xuống còn $3,3 \times 10^2$ CFU/mL sau 48 giờ [60]. Năm 2023, nhóm tác giả Võ Thị Tú Anh và cộng sự đã nghiên cứu khả năng kháng đặc hiệu của TKT phân lập từ mẫu mô thu thập từ một chợ địa phương ở Việt Nam đối với chủng *V. paraheamolyticus* và cho thấy KIT04 làm giảm đáng kể mật độ *V. paraheamolyticus* ATCC 17802 [61]. Nhóm tác giả Lê Hoàng Bảo Ngọc và cộng sự (2024) đã nghiên cứu ảnh hưởng TKT đến mô bệnh học và khả năng kháng bệnh trên tôm gây ra bởi *V. parahaemolyticus* B4XOT2.2 phân lập từ bùn ao bệnh. Kết quả cho thấy mật độ *Vibrio* spp. đều giảm trên ba nhóm tuổi tôm khác nhau và các dấu hiệu bệnh lý, đặc điểm mô bệnh học của mẫu tôm nhiễm bệnh đều được phục hồi [62]. Ở phía Bắc, nhóm nghiên cứu Lê Tuấn Sơn và cộng sự đã thực hiện đề tài nghiên cứu phân lập TKT bản địa tại Hải Phòng có khả năng phòng và trị bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm với kết quả là 02 quy trình phân lập TKT bản địa và 01 quy trình sản xuất TKT lỏng. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu cụ thể nào về hoạt tính ly giải *Vibrio* của TKT trên các chủng *Vibrio* có khả năng gây bệnh trên tôm tại phía Bắc Việt Nam.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Nguồn mẫu phân lập TKT

Tổng số 27 mẫu, bao gồm 18 mẫu nước và 9 mẫu tôm có dấu hiệu hoặc chết do bệnh, được thu thập tại các ao nuôi tôm tại huyện Tiên Yên và Đàm Hà, tỉnh Quảng Ninh trong khoảng thời gian từ 03/04/2023 đến 11/10/2023 để phân lập vi khuẩn *Vibrio*. Ngoài ra, 12 mẫu bùn cũng được thu thập để phân lập TKT. Các mẫu được bảo quản trong đá và vận chuyển về phòng thí nghiệm của Công ty cổ phần công nghệ thủy sản AVITECH. Trước khi thực hiện thí nghiệm, các mẫu được bảo quản ở 4°C.

Bảng 2.1. Thông tin các mẫu được thu thập tại tỉnh Quảng Ninh

Ngày lấy mẫu	Vị trí ao	Mẫu nước	Mẫu tôm	Mẫu bùn
03/04/2023	Đông Ngũ, Tiên Yên	6	3	4
20/07/2023	Tân Lập, Đàm Hà	6	3	4
11/10/2023	Đông Hải, Tiên Yên	6	3	4

2.1.2. Hóa chất

Một số hóa chất chính dùng cho thí nghiệm: Cao nấm men (Trung Quốc), peptone (Trung Quốc), NaCl (Trung Quốc), NaOH (Trung Quốc), HCl (Trung Quốc), MgCl₂ (Trung Quốc), MgSO₄ (Trung Quốc), gelatin (Trung Quốc), Tris-HCl (Mỹ), thạch (Việt Nam) và một số hóa chất phân tích khác.

2.1.3. Trang thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ được sử dụng trong nghiên cứu: Máy vortex (Vision Scientific, Hàn Quốc), Cân kỹ thuật (Precisa, Thụy Sĩ), Máy ly tâm lạnh (Biofuge Fresco, Đức), Máy lắc có kiểm soát nhiệt độ (BSI-25R CPT, Mỹ), Nồi khử trùng (ALP MC-40DP, Nhật Bản), Tủ ẩm (Trung Quốc), Lò vi sóng (Sharp, Nhật Bản), Tủ lạnh sâu -80°C, Tủ cấy vô trùng (Sanyo, Nhật Bản), Pipet các loại (Effendorf, Mỹ) và một số vật tư tiêu hao khác.

2.1.4. Môi trường và dung môi

Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) (g/L): Sucrose 20; dipeptone 10; sodium citrate 10; sodium thiosulfate 10; NaCl 10; cao nấm men 5; oxbile 5; sodium cholate 3; ferric citrate 1; bromothymol blue 0,04; thymol blue 0,04; thạch 15.

Chromagar (g/L): peptone và cao nấm men 8; NaCl 5; Sodium deoxycholate 1; hỗn hợp chromogenic 0,3; polypropylene glycol 10,5; thạch 15.

Alkaline saline peptone water (ASPW, g/L): Peptone 10; NaCl 15.

Dung dịch đệm SM (Sodium chloride, Magnesium sulphate) (mL/L): 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄ và 0,01% gelatin.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn *Vibrio* spp.

Các chủng *Vibrio* được phân lập từ các mẫu nước ao nuôi, tôm bệnh, mẫu đất bùn và nước xung quanh trang trại nuôi tôm được thu thập từ tháng 04/2023-10/2023 tại tỉnh Quảng Ninh. Các mẫu nước được pha loãng và cấy trang trên đĩa chứa môi trường đặc hiệu TCBS (Himedia, Ấn Độ) để phân lập vi khuẩn *Vibrio* [63]. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ và sau đó quan sát hình thái khuẩn lạc. Các khuẩn lạc có hình thái đặc trưng trên môi trường TCBS (theo mô tả nhà cung cấp môi trường) được cấy rìa làm sạch và lưu giữ trên môi trường thạch ASPW. Các chủng thuần được bảo quản trong glycerol 30% ở -80°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Các chủng *Vibrio* spp. phân lập được xác định các đặc điểm hình thái bằng Kit Gram Stain (Himedia, Ấn Độ) theo hướng dẫn nhà sản xuất. Hoạt tính catalase được xác định dựa vào khả năng tạo bọt hay không tạo bọt của các dòng vi khuẩn khi cho khuẩn lạc vào dung dịch H₂O₂ 3%. Hoạt tính oxidase được xác định dựa vào khả năng làm thay đổi màu Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride của các dòng vi khuẩn [64].

2.2.2. Phương pháp định danh vi khuẩn *Vibrio* spp.

Các chủng *Vibrio* spp. phân lập được tách chiết DNA bằng Kit nucleic acid TracePure™ (LabNova, Việt Nam) theo hướng dẫn nhà sản xuất.

Trình tự gene 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1492R (5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') với chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: giai đoạn sơ khởi 95 °C (5 phút); 30 chu kỳ: 95 °C (1 phút) - 53 °C (30 giây) - 72 °C (90 giây) - 72 °C (5 phút). Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kích thước của các DNA tổng số thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang DNA chuẩn (Thermo scientific, Mỹ) và gửi đến First BASE Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia) để giải trình tự. Kết quả giải trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit 7.2 và so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI) nhờ công cụ BLAST. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên mức độ tương đồng của các trình tự nucleotide giữa các loài được tính toán thống kê bằng phần mềm MEGA 11. Cây phát sinh chủng loại được thiết lập trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Kimura, sử dụng phương pháp Neighbor-joining. Giá trị Bootstrap của cây phát sinh chủng loại được phân tích trên 1000 mẫu thử [65].

Trình tự gene 16S rRNA của các chủng vi khuẩn nhận được trong nghiên cứu này được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) dựa theo hướng dẫn của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.3. Phương pháp phân lập và tinh sạch thực khuẩn thể

Phân lập thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể được phân lập từ các mẫu nước và bùn theo phương pháp của Võ Thị Tú Anh và cộng sự [61]. Các mẫu được ly tâm ở 8.000 rpm trong 10 phút thu dịch nổi và trộn với một lượng môi trường ASPW (2X) tương đương. Sau 8h nuôi lắc ở 37°C, hỗn hợp được ly tâm ở 8.000 ×g trong 5 phút. Sau đó, dịch nổi được trộn với dịch nuôi qua đêm của vi khuẩn *Vibrio* phân lập được ($OD_{600} \sim 0,5 = 8 \log \text{ cfu/mL} = 10^8 \text{ cfu/mL}$) và nuôi lắc qua đêm, sau đó ly tâm ở 10.000 rpm trong 10 phút ở 4°C. Dịch nổi được lọc qua màng cellulose axetat vô trùng 0,22 μm để loại bỏ vi khuẩn và bảo quản ở 4°C được gọi là dịch ly giải. Thực khuẩn thể được phát hiện bằng phương pháp thạch hai lớp của Kropinski và cộng sự (2009) [66]. Khoảng 10 μL dịch ly giải thu được được nhỏ lên đĩa thạch 2 lớp đã được bổ sung 100 μL vi khuẩn *Vibrio* và để đĩa khô ở nhiệt độ phòng. Sau đó, đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ và

quan sát sự hình thành vùng ly giải trên lớp vi khuẩn. Tại các vùng ly giải quan sát được, đầu tip pipette vô trùng được sử dụng để lấy phần ly giải ra cho vào 10 ml môi trường ASPW lỏng và 100 μ L dịch nuôi của vi khuẩn *Vibrio* phân lập, nuôi lắc qua đêm ở 37°C. Hỗn hợp dịch nuôi được ly tâm 10.000 rpm trong 10 phút để thu dịch nổi, sau đó lọc qua màng 0,22 μ m để loại vi khuẩn và thu được dịch TKT.

Tinh sạch thực khuẩn thể:

Dịch TKT được pha loãng bằng đệm SM và được bổ sung vào dịch nuôi cấy vi khuẩn *Vibrio* ($OD_{600} \sim 0,5$) trong môi trường ASPW chứa 0,3% thạch và sau đó phủ lên môi trường ASPW chứa 1,5% thạch. Sau khi ủ qua đêm, các vết tan riêng rẽ được thu thập để làm sạch. Các vết tan được thu thập bằng cách sử dụng đầu tip pipette và hòa lại vào 1 mL đệm SM, sau đó vortex nhẹ để TKT hòa vào đệm. Hỗn hợp được ly tâm 8.000 rpm trong 5 phút để thu dịch nổi. Dịch nổi được lọc qua màng 0,22 μ m để loại vi khuẩn. Dịch sau lọc tiếp tục lặp lại các bước tinh sạch ít nhất bốn lần cho đến khi TKT đồng đều về kích thước. TKT tinh sạch được bảo quản trong đệm SM ở 4°C.

2.2.4. Quan sát hình thái thực khuẩn thể

Hình thái TKT được quan sát và phân tích bằng phương pháp sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM, Transmission electron microscopy) tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Mẫu được chuẩn bị như sau: nhỏ 20 μ L dịch TKT tinh sạch (8 log PFU/mL) lên mạng lưới đồng phủ carbon và nhuộm âm bản bằng dung dịch 2% uranyl axetat (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 100 kV. Thực khuẩn thể được phân loại dựa các nguyên tắc phân loại của ICTV.

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

Tỷ lệ lây nhiễm (MOI) là tỷ lệ số lượng thực khuẩn thể cần thiết để ly giải *Vibrio* được xác định theo phương pháp của Liang và cộng sự (2022) [54]. Để xác định MOI tối ưu, TKT được pha loãng theo dải nồng độ ở các tỷ lệ MOI là 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 PFU/CFU. Vi khuẩn (~ 8 log CFU/mL) được lây nhiễm TKT ở các nồng độ MOI khác nhau, đối chứng là vi khuẩn chưa được lây nhiễm TKT. Tất cả các mẫu được nuôi lắc 150 rpm ở

37°C trong 10 giờ. Các mẫu được ly tâm ở 8.000 rpm trong 5 phút ở 4°C và thu dịch nổi. Dịch nổi được lọc qua màng 0,22 µm và được kiểm tra mật độ TKT bằng phương pháp thạch hai lớp. Tỷ lệ cho mật độ TKT cao nhất là MOI tối ưu. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.2.6. Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn của thực khuẩn thể C1 *in vitro*

Để phát hiện tiềm năng ứng dụng, tác dụng kháng khuẩn của TKT C1 chống lại vi khuẩn chủ đã được nghiên cứu theo phương pháp của Liang và cộng sự (2022) với một số thay đổi [54]. Vi khuẩn (8 log CFU/mL) được lây nhiễm TKT C1 với tỷ lệ MOI khác nhau trong bình có chứa 20 mL môi trường ASPW, đối chứng là bình không bổ sung TKT C1. Các bình được nuôi lắc ở 37°C, 150 rpm. Bắt đầu từ 0 giờ, giá trị độ hấp thụ (OD₆₀₀) được đo sau mỗi 1 giờ trong 10 giờ. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.2.7. 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 Yang và cộng sự (2020) như sau [55]: Trộn đều TKT với 500 µL dịch vi khuẩn (~8 log CFU/mL) với tỷ lệ MOI tối ưu. Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 15 phút để TKT được hấp phụ, sau đó ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 30 giây ở nhiệt độ phòng để loại bỏ TKT không hấp phụ. Phần cặn có chứa vi khuẩn hấp phụ TKT được hòa lại trong 10 mL môi trường ASPW. Lấy 100 µL mẫu mỗi 20 phút trong 2 giờ để xác định mật độ TKT. TKT trong mỗi mẫu được xác định bằng phương pháp thạch hai lớp, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thời kỳ tiềm tàng được xác định trực tiếp trên đường cong sinh trưởng và hệ số nhân vi rút được tính theo công thức sau:

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

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.

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

- Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng đối với khả năng sống sót của TKT. Để xác định sự ảnh hưởng của nhiệt độ đối với TKT, thí nghiệm được thực

hiện theo phương pháp của Ding và cộng sự (2020) [51] như sau: Dịch TKT tinh sạch có mật độ khoảng 8 log PFU/mL được ủ trong vòng 1 giờ ở các điều kiện nhiệt độ 20°C, 35°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C và 80°C. Mật độ TKT được xác định bằng phương pháp thạch hai lớp.

- Khảo sát ảnh hưởng của pH

Để đánh giá ảnh hưởng của pH đến TKT, thí nghiệm được tiến hành dựa trên phương pháp được mô tả bởi Ding và cộng sự (2020) có sự sửa đổi [51]: Môi trường ASPW được chuẩn bị ở các giá trị pH khác nhau từ 3 đến 12. Dịch TKT tinh sạch (1mL) được hòa vào 9 mL môi trường ASPW có pH khác nhau đạt mật độ 8 log PFU/mL và ủ ở 35°C trong 1 giờ. Mật độ TKT được xác định bằng phương pháp thạch hai lớp.

2.2.9. Phương pháp xử lý số liệu

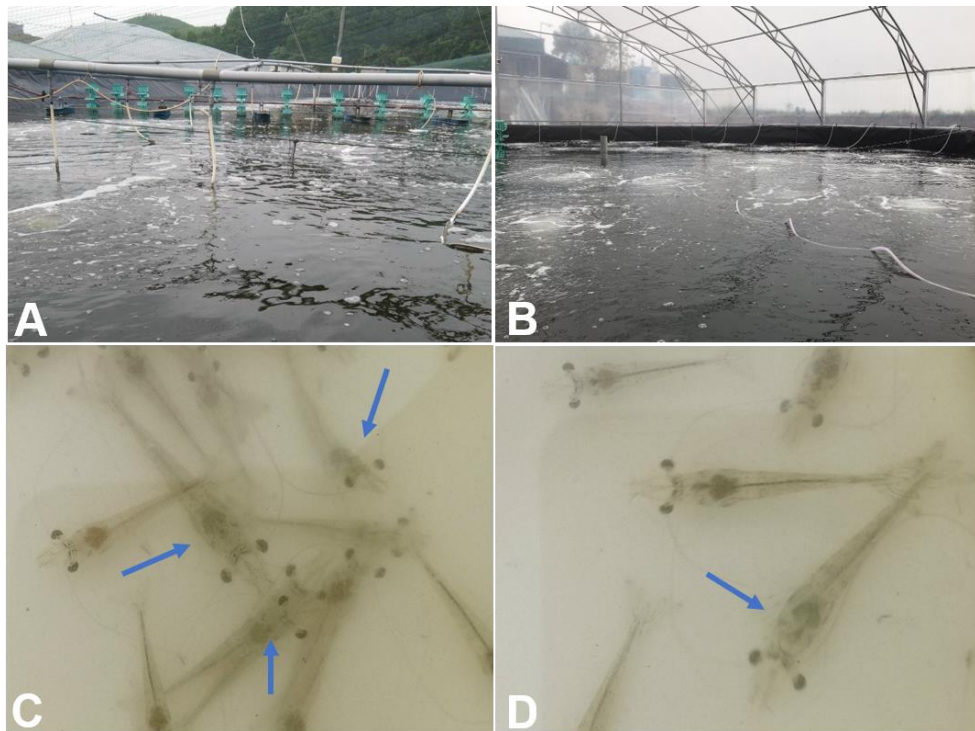
Dữ liệu (biểu thị bằng trung bình \pm độ lệch chuẩn của trung bình của ba lần thí nghiệm) được tính toán qua Microsoft Excel 2013.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh các chủng *Vibrio* spp. từ mẫu tôm bệnh và nước ao nuôi tôm.

3.1.1. Phân lập *Vibrio* spp. từ các mẫu nhiễm bệnh hoại tử gan tụy cấp tính

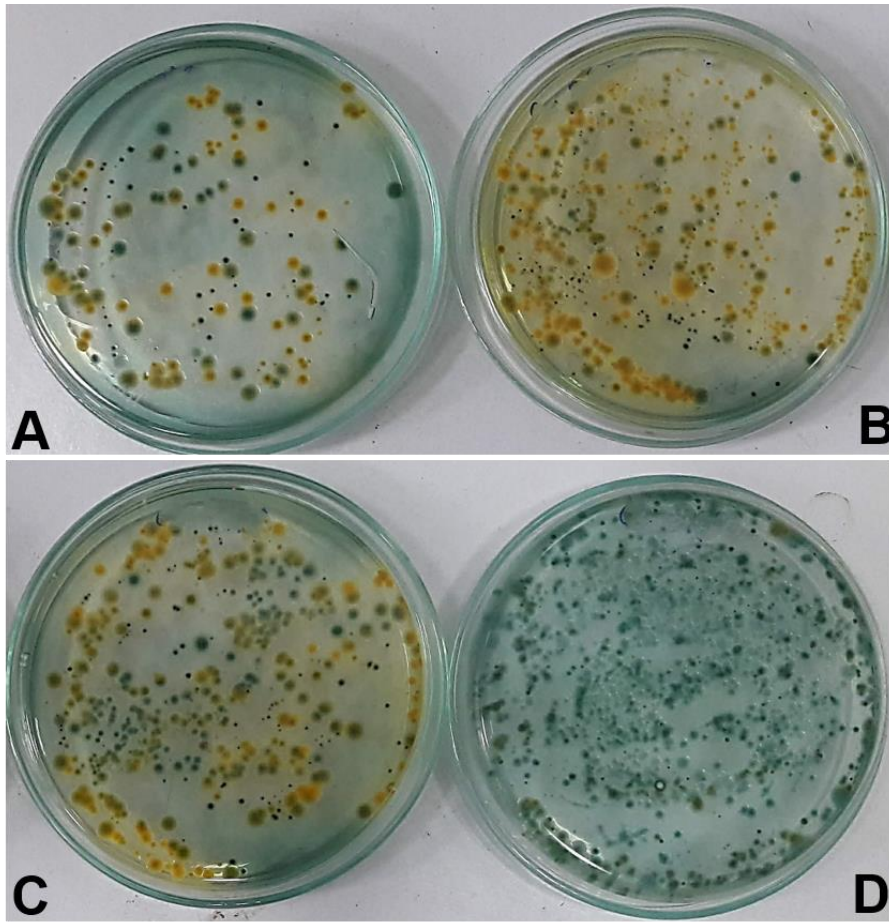
Quá trình thu thập các mẫu nước ao, bùn và tôm bị bệnh được diễn ra từ tháng 4 - 10/2023 tại các ao nuôi tôm ở tỉnh Quảng Ninh (Hình 3.1). Tổng cộng 6 mẫu nước và 3 mẫu tôm bệnh được thu thập tại mỗi ao và mật độ tổng vi khuẩn *Vibrio* được đánh giá trên môi trường thạch chỉ thị TCBS.



Hình 3.1. Hình ảnh minh họa cho quá trình thu thập mẫu nước (A,B) và tôm bị bệnh (C,D) tại Đông Ngũ, Tiên Yên, Quảng Ninh

Sau 16 đến 24 giờ nuôi cấy ở 37°C, khuẩn lạc được hình thành có đường kính khoảng 2 đến 5 mm, hình tròn, mép đều, hơi lồi, màu sắc thay đổi tùy theo loài thuộc chi *Vibrio*. Khuẩn lạc có màu vàng đặc trưng cho các chủng *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* và màu xanh trên các chủng *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* [67]. Sự khác biệt về màu sắc này là do thành phần sucrose trong môi trường TCBS và là cơ sở để phân biệt các loài *Vibrio* quan trọng. Vi khuẩn *Vibrio* sử dụng được sucrose và sinh ra

axit làm thay đổi màu chất chỉ thị bromothymol blue và thymol blue thành màu vàng, trong khi vi khuẩn không sử dụng sucrose có màu xanh lục.



Hình 3.2. Hình ảnh đĩa phân lập các chủng *Vibrio* trên môi trường TCBS ở 37°C sau 24 giờ. Đĩa phân lập mẫu tôm và nước ao thu nhận tại Đông Ngũ, Tiên Yên (A,B) và Tân Lập, Đầm Hà (C, D).

Kết quả cho thấy mật độ tổng *Vibrio* trong mẫu nước tại Tân Lập, Đầm Hà cao nhất, đạt $2,96 \pm 0,25 \times 10^4$ CFU/mL (Bảng 3.1). Mật độ *Vibrio* spp. thấp hơn được ghi nhận ở Đông Ngũ, Tiên Yên ($1,75 \pm 0,2 \times 10^4$ CFU/mL) và Đông Hải, Tiên Yên ($3,87 \pm 0,12 \times 10^3$ CFU/mL). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu trước đây, khẳng định rằng mật độ tổng *Vibrio* trong nước nuôi tôm dao động từ 10^2 đến 10^4 CFU/mL [68]. Sự dao động này phụ thuộc vào độ mặn, nhiệt độ và mùa khô hay mùa mưa.

Bên cạnh các mẫu nước, tôm có biểu hiện hoạt động chậm chạp, bỏ ăn và lơ lơ được tách bỏ lớp vỏ đầu ngực để thu mẫu gan tụy và sau đó đánh giá mật độ *Vibrio* spp. Kết quả Bảng 3.1 cho thấy không có sự khác biệt lớn giữa

các mẫu gan tụy thu thập từ 3 nơi, dao động từ $1,35 \pm 0,22 \times 10^3$ đến $3,17 \pm 0,16 \times 10^3$ CFU/g (Bảng 3.1). Kết quả nghiên cứu mẫu gan tụy tôm ở các trang trại nhiễm bệnh cho thấy mật độ *Vibrio* spp. cao nhất từng được ghi nhận là $2,59 \times 10^7$ CFU/g [69].

Bảng 3.1. Đánh giá mật độ *Vibrio* từ các mẫu thu thập tại tỉnh Quảng Ninh

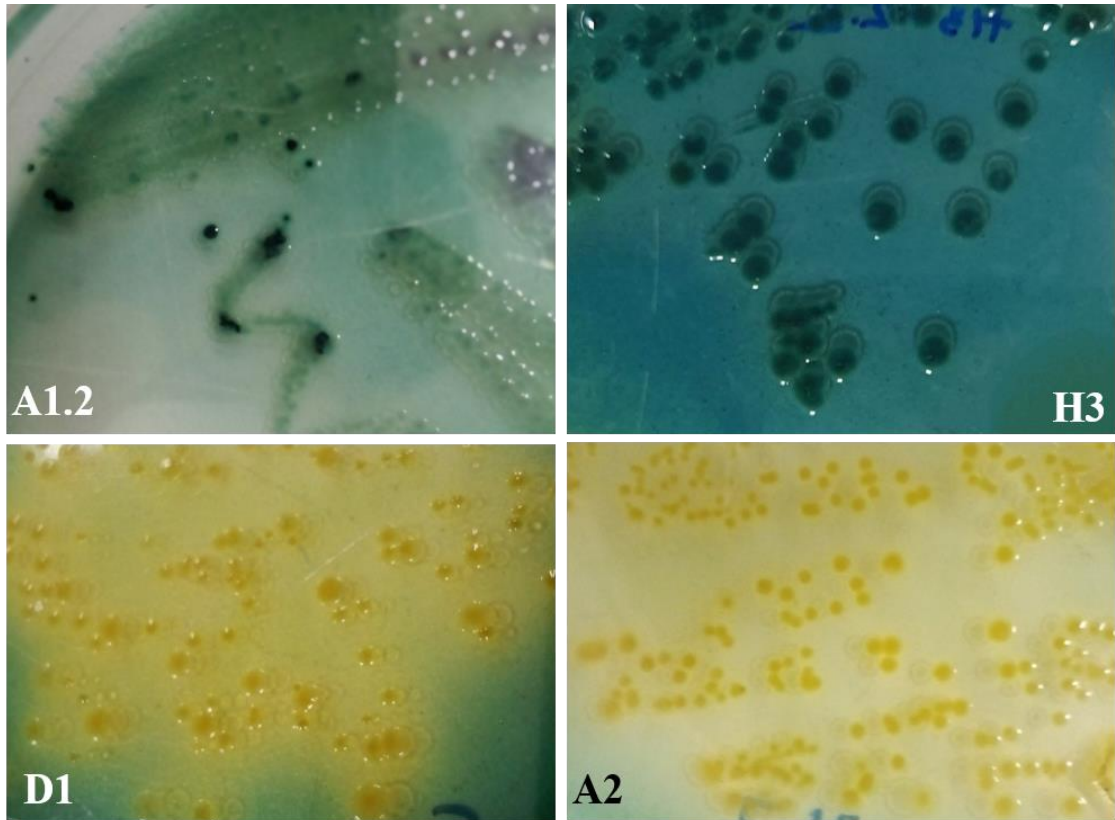
TT	Địa điểm	Mật độ <i>Vibrio</i> (CFU/mL hoặc g)		Số lượng <i>Vibrio</i> spp. phân lập được
		Gan tụy	Nước	
1	Đông Ngũ-Tiên Yên	$3,17 \pm 0,16 \times 10^3$	$1,75 \pm 0,2 \times 10^4$	8
2	Đông Hải-Tiên Yên	$1,35 \pm 0,22 \times 10^3$	$3,87 \pm 0,12 \times 10^3$	4
3	Tân Lập-Đầm Hà	$2,47 \pm 0,13 \times 10^3$	$2,96 \pm 0,25 \times 10^4$	6

Từ các mẫu phân lập, chúng tôi thu được 18 chủng *Vibrio* thuần khiết. Quan sát đặc điểm hình thái trên môi trường thạch TCBS và ASPW cho thấy các chủng này có hình thái khuẩn lạc được chia thành 4 nhóm khác nhau.

3.1.2. Phân loại các chủng *Vibrio*

3.1.2.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái

Tất cả các chủng tuyển chọn đều phát triển mạnh trên môi trường thạch TCBS. Trong đó, 4 chủng có khuẩn lạc màu xanh, tròn, lồi, bóng và màu xanh nhạt đến đậm sau 72 giờ nuôi cấy (Hình 3.3). Đặc biệt, chủng D1 và A2 có màu vàng sau 24 giờ nuôi cấy và dần ngả sang màu xanh nếu kéo dài thời gian nuôi cấy. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy các chủng đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm và hình que. Ngoài ra, các chủng có thể di động, không sinh bào tử và phản ứng dương tính với oxidase và catalase. Các đặc điểm cơ bản này điển hình cho các vi khuẩn thuộc chi *Vibrio*.

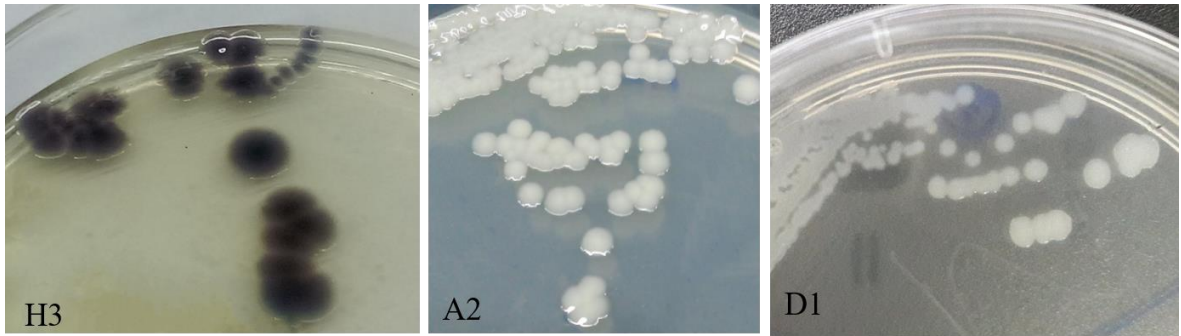


Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc của 4 chủng *Vibrio* trên môi trường TCBS

Bảng 3.2. Hình thái các chủng *Vibrio* spp. đặc trưng phân lập được

Tên chủng vi khuẩn	Gram	Đường kính (mm)	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc
A1.2	-	1-1,5	Khuẩn lạc tròn bóng, hơi lồi, mép đều, có màu xanh đậm
H3	-	2-3	Khuẩn lạc có hình tròn bóng, hơi lồi, mép đều, có màu xanh đậm ở tâm, viền mờ
D1	-	1-3	Khuẩn lạc tròn bóng, hơi lồi, mép đều, màu vàng và chuyển dần sang màu xanh khi già
A2	-	1-2	Khuẩn lạc có màu vàng, tròn bóng, hơi lồi, mép đều

Chú thích: (-) Gram âm

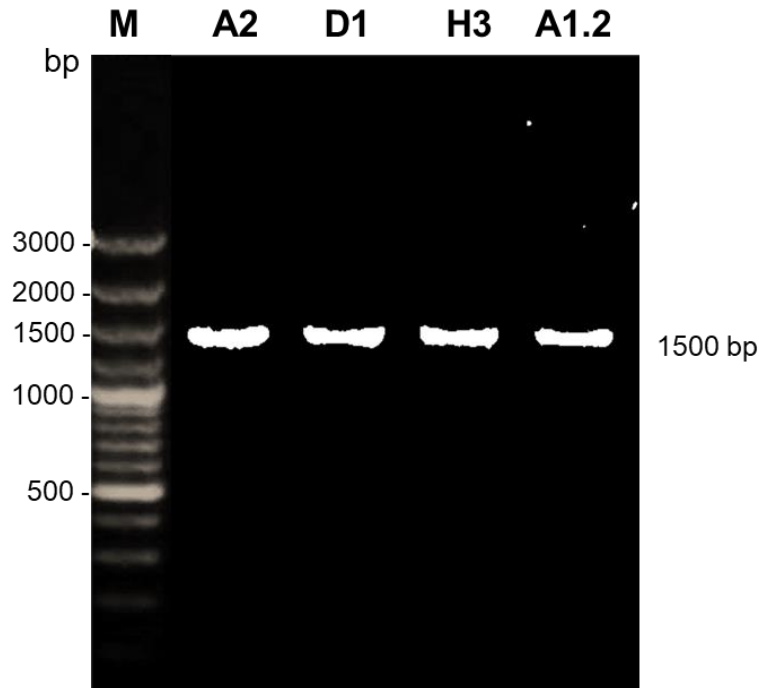


Hình 3.4. Hình thái khuẩn lạc của 3 chủng *Vibrio* trên môi trường Chromagar

Kết quả đánh giá hình thái khuẩn lạc trên môi trường chỉ thị Chromagar cho thấy, chủng H3 có màu tím đen đậm và 2 chủng A2 và D1 có màu trắng sữa. Đối chiếu với hướng dẫn của nhà sản xuất về môi trường Chromagar, 3 chủng trên đều thuộc chi *Vibrio*, phù hợp với kết quả từ môi trường TCBS. Trong đó, chủng H3 có màu sắc đặc trưng của chủng *V. parahaemolyticus*, 2 chủng A2 và D1 đặc trưng cho *V. alginolyticus*.

3.1.2.2. Khuếch đại gen 16S rRNA

Để phân loại 4 chủng vi khuẩn tới loài, giải trình tự và phân tích gen 16S rRNA được sử dụng. Kết quả tách chiết DNA tổng số bằng Kit của 4 chủng phân lập cho một băng DNA rõ nét với nồng độ DNA dao động từ 13 đến 68 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Các mẫu DNA thu nhận đủ tiêu chuẩn để làm khuôn trong phản ứng khuếch đại gen 16S rRNA. Gen 16S rDNA là vùng mã hóa các RNA ribosome được xác định là đoạn gen được bảo tồn nhất ở tất cả các tế bào vi khuẩn. Trình tự các đoạn gen này ở các vi khuẩn có khoảng cách di truyền rất xa nhau vẫn tìm thấy có sự giống nhau. Đây cũng là vùng rất linh hoạt, sự thay đổi trình tự các nucleotide ở vùng này được ứng dụng nhiều trong phân loại các dòng vi khuẩn. Để khuếch đại gen 16S rDNA, cặp mồi chuẩn 27F và 1492R hiện đang sử dụng ở nhiều phòng thí nghiệm nghiên cứu vi khuẩn trên thế giới được sử dụng. Kết quả khuếch đại gen 16S rRNA được thể hiện ở Hình 3.5.

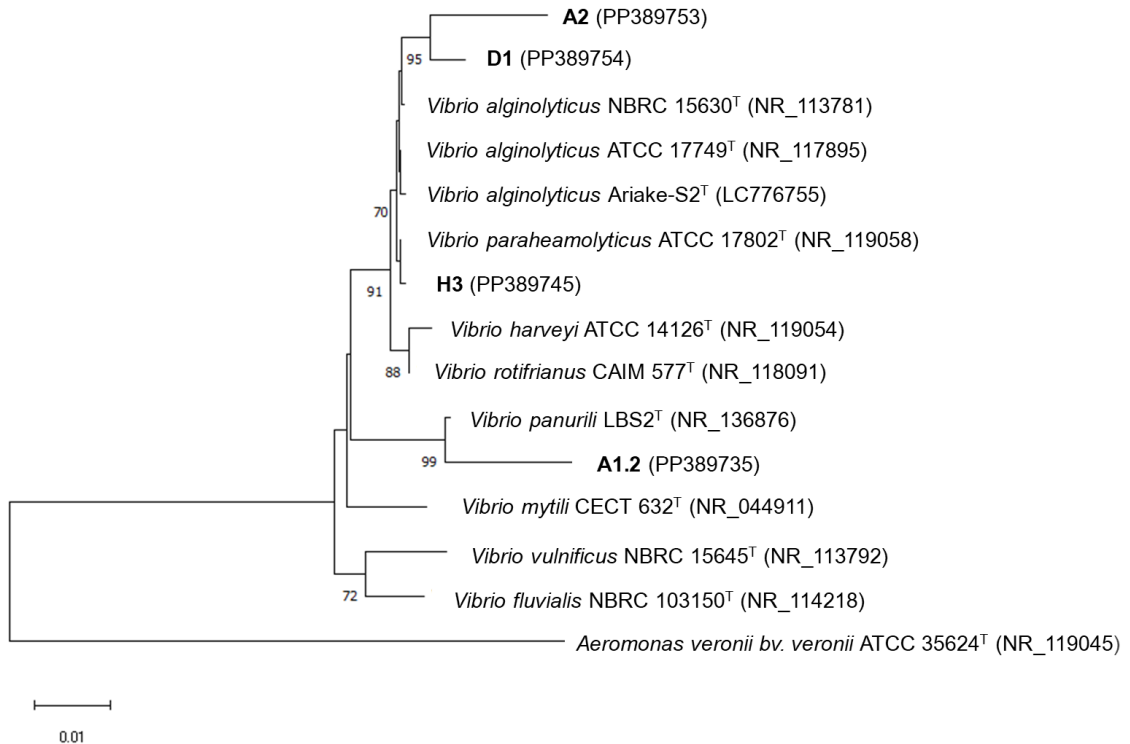


Hình 3.5. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA trên gel agarose 1,0%. Chú thích: M, thang DNA chuẩn (Thermo Scientific).

Kết quả Hình 3.5 cho thấy sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA của các chủng phân lập cho băng sáng, rõ nét với kích thước khoảng 1,5 kb. Các sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu và đủ tiêu chuẩn để tinh sạch DNA. Sản phẩm sau tinh sạch được gửi đi giải trình tự tại First BASE Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia).

3.1.2.3. Phân tích trình tự gen 16S rRNA

Từ kết quả nhận được, các trình tự gen 16S rRNA của 4 chủng vi khuẩn phân lập được so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI) bằng công cụ BLAST. Cây phân loại xây dựng dựa trên phần mềm MEGA11 được thể hiện ở Hình 3.6.



Hình 3.6. Mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn phân lập A1.2, A2, D1 và H3 với các chủng tham chiếu chuẩn.

Kết quả phân tích và so sánh trình tự 16S rRNA với các trình tự gen công bố trên GenBank cho thấy, chủng H3 có độ tương đồng cao (99%) với trình tự 16S rRNA của chủng tham chiếu *V. paraheamolyticus* ATCC 17802^T (NR_119058). Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự 16S rRNA cũng cho thấy chủng H3 tạo thành một nhánh riêng với chủng tham chiếu *Vibrio paraheamolyticus* ATCC 17802^T. Kết hợp với các đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng H3 có họ hàng gần với loài *V. paraheamolyticus*. Trình tự 16S rRNA của chủng H3 được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) với mã truy cập là PP389745. *V. parahaemolyticus* là loài luôn tồn tại ở các hệ sinh thái nước mặn và vùng cửa sông, đặc biệt ở các ao nuôi thủy sản tại khu vực Châu Á. Kết quả phân tích mật độ *V. parahaemolyticus* trên các động vật phù du, cá và giáp xác cho thấy chủng vi khuẩn luôn hiện diện. Nguyên nhân do *V. parahaemolyticus* có khả năng phát triển tốt hơn so với các loài vi khuẩn khác trong môi trường nước biển có nhiệt độ và độ mặn tương đối cao. *V. paraheamolyticus* 3HP và 5HP được phân lập từ gan tụy của tôm thẻ *Penaeus vannamei* bị bệnh AHPND

được thu thập từ một trang trại nuôi tôm ở bờ biển phía tây của Guft, Thái Lan [70]. López-León và cộng sự (2016) đã phân lập được 11 chủng *V. paraheamolyticus* gây bệnh trên tôm từ gan tụy của tôm thẻ chân trắng bị bệnh tại các trang trại thương mại ở Guasave, Sinaloa, Mexico [71]. Kết quả này minh chứng rằng có thể chủng *V. paraheamolyticus* H3 có thể gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm.

Bảng 3.3. Kết quả định danh trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn phân lập trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI)

Tên chủng phân lập	Tên chủng tham chiếu	Độ tương đồng (%)	Mã số GenBank
H3	<i>V. paraheamolyticus</i> ATCC 17802 ^T	99	NR_119058
A2	<i>V. alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	99	NR_113781
	<i>V. alginolyticus</i> NBRC 17749 ^T	99	NR_117895
D1	<i>V. alginolyticus</i> NBRC 15630 ^T	99	NR_113781
	<i>V. alginolyticus</i> NBRC 17749 ^T	99	NR_117895
A1.2	<i>V. panurili</i> LBS2 ^T	87	NR_136876

Bên cạnh đó, so sánh trình tự gen 16S rRNA của hai chủng A2 và D1 với các gen tham chiếu trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) cho thấy, 2 chủng A2 và D1 thể hiện độ tương đồng cao với các chủng tham chiếu *V. alginolyticus* NBRC 15630^T (99%) và *V. alginolyticus* NBRC 17749^T (99%). Hơn nữa, 2 chủng tạo thành nhóm riêng biệt với các chủng thuộc chi *V. alginolyticus* trên cây phân loại. Kết hợp đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA, hai chủng này có họ hàng gần với loài *V. alginolyticus*. Trình tự 16S rRNA của chủng A2 và D1 được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) với mã truy cập lần lượt là PP389753 và PP389754. *V. alginolyticus* là loài gây bệnh phân trắng trên tôm và phân bố rộng rãi ở các vùng nước ven biển trên toàn thế giới. Chúng cũng gây ra nhiều loại bệnh

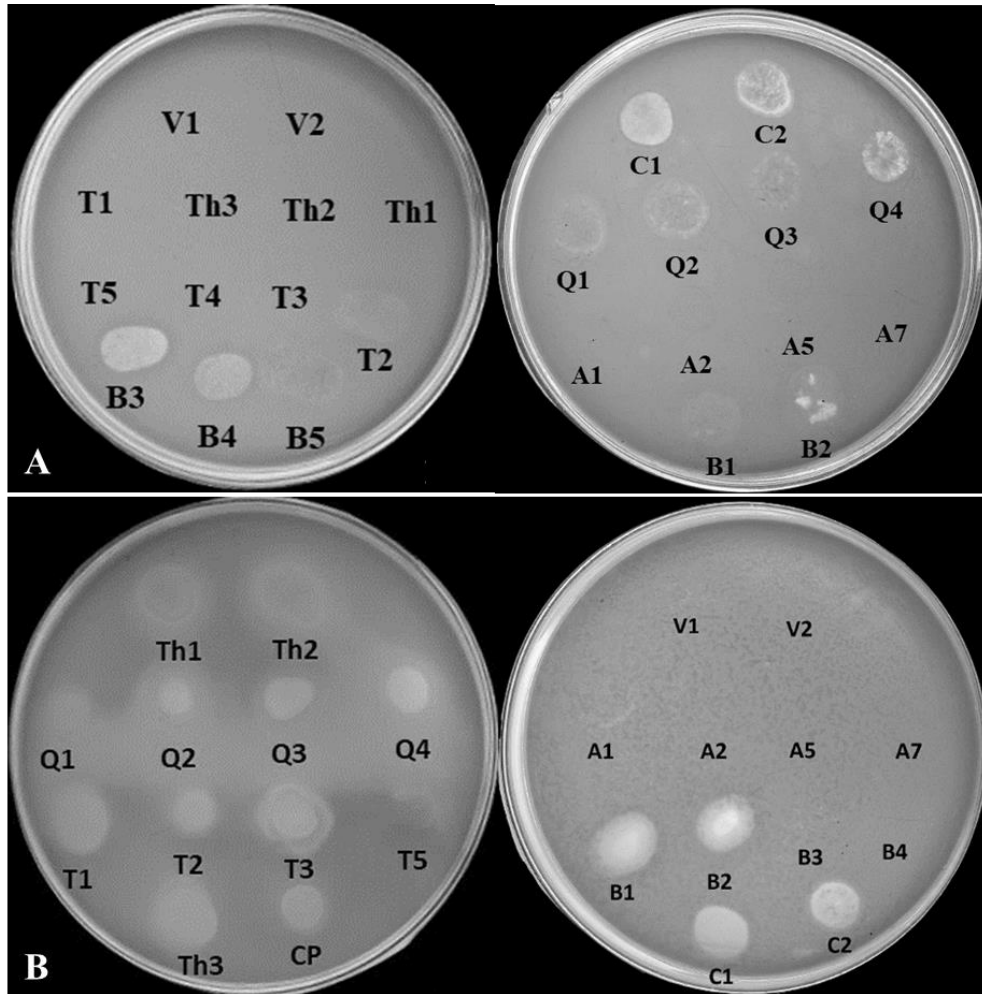
khác với các động vật thủy sinh khác như cá và động vật có vỏ, dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng. Fu và cộng sự (2023) đã phân lập được 40 chủng *V. alginolyticus* từ mẫu tôm, cá bị bệnh và các mẫu nước thải từ các ao nuôi trồng thủy sản ở các vùng khác nhau ở Trung Quốc. Trong đó, hai chủng phân lập *V. alginolyticus* VA15 và VA17 là hai chủng mang 12 gen độc tố gây bệnh [57]. Dự đoán rằng 2 chủng A2 và D1 là tác nhân gây bệnh phân trắng trên tôm mà chúng tôi thu nhận được.

Kết quả phân tích và so sánh trình tự 16S rRNA của chủng A1.2 cho thấy chủng A1.2 có độ tương đồng 87% với chủng *V. panurili* LBS2^T (NR_136876). Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự 16S rRNA, giá trị bootstrap giữa A1.2 và *V. panurili* LBS2^T là 99%. Do vậy, chủng A1.2 được tạm phân loại thuộc loài *Vibrio* sp.. Trình tự 16S rRNA của chủng A1.2 được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) với mã truy cập là PP389735.

3.2. Phân lập và sàng lọc thực khuẩn thể có khả năng ly giải *Vibrio* spp.

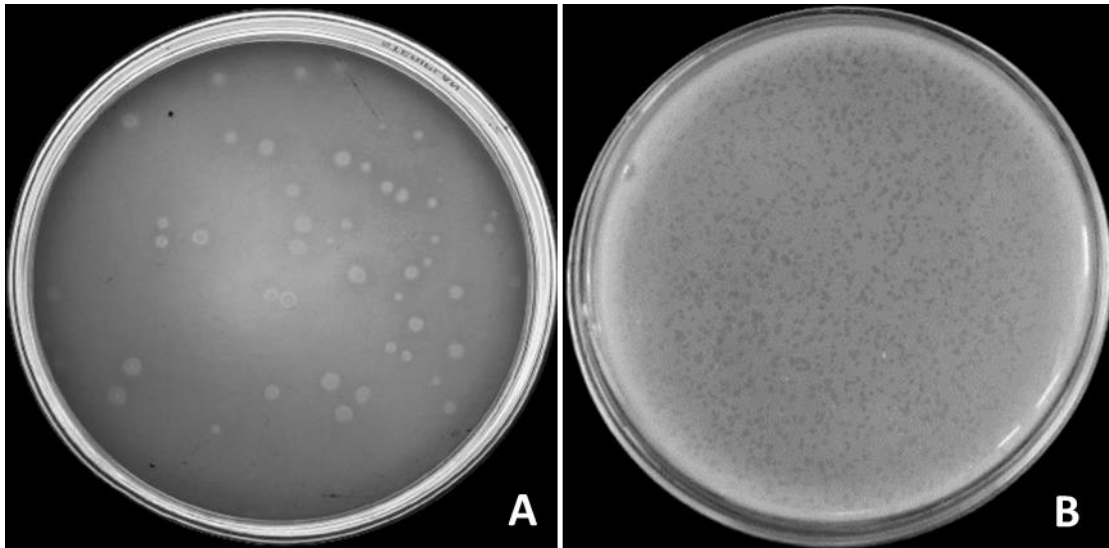
3.2.1. Phân lập và tinh sạch thực khuẩn thể có khả năng ly giải *Vibrio* spp.

Chủng vi khuẩn *V. paraheamolyticus* là nguyên nhân chính gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp tính và *V. alginolyticus* gây ra bệnh phân trắng nên được chọn làm vi khuẩn kí chủ để phân lập TKT. Chủng *V. alginolyticus* D1 có khả năng phát triển mạnh hơn chủng *V. alginolyticus* A2 nên chủng D1 được sử dụng làm ký chủ. Từ 12 mẫu bùn và 18 mẫu nước trong các ao nuôi tôm bị bệnh, đã ghi nhận được sự có mặt của TKT trong một số mẫu phân lập, TKT thể hiện bằng vết tan trong ở vị trí nhỏ giọt trên môi trường thạch 2 lớp. Đối với *V. paraheamolyticus* H3, có 12/30 mẫu xuất hiện vết tan từ mờ đến trong gồm B1-5, T2, C1, C2, Q1-4 và 16/30 mẫu ghi nhận sự có mặt của TKT khi *V. alginolyticus* D1 được sử dụng làm ký chủ gồm Th1-3, Q1-4, T1-3, CP, B1, B2, C1, C2, A1 (Hình 3.7). Tất cả các dòng TKT được tinh sạch ít nhất 4 lần cho đến khi quan sát thấy các vết tan riêng lẻ, có kích thước và hình dạng đồng đều (Hình 3.8). Từ 30 mẫu nước ao và bùn đã phân lập được 7 TKT tinh sạch, có kích thước vết tan từ 0,5 đến 3 mm, bao gồm C1, C2, B1, B2, B3, B4, Q4. Các TKT sau tinh sạch được giữ ở 4°C cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.7. Kết quả phân lập TKT bằng phương pháp nhỏ giọt trên môi trường thạch hai lớp có vi khuẩn *V. parahaemolyticus* H3 (A) và *V. alginolyticus* D1 (B) làm ký chủ.

Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây chứng minh rằng TKT rất phong phú và đa dạng trong môi trường ao nuôi tôm. Hossain và cộng sự (2024) đã phân lập được TKT từ nước thải của các ao nuôi tôm ở các vùng phía nam Banglades có khả năng lây nhiễm 91% các chủng *Vibrio* thử nghiệm [72]. Hao và cộng sự (2023) cũng đã phân lập được TKT VA5 từ nước ao nuôi và nước thải ao nuôi thủy sản ở thành phố Liên Vân Cảng, Trung Quốc có khả năng giảm tỉ lệ chết trên tôm bị nhiễm *V. alginolyticus* [73]. Năm 2021, Dubey và cộng sự đã phân lập được 12 dòng TKT đặc hiệu *V. parahaemolyticus* từ 264 mẫu nước thu thập từ các trang trại nuôi tôm nước mặn nội địa. Trong đó, TKT V5 có dạng sợi, là thành viên của họ *Inoviridae* cho thấy hiệu quả ly giải *V. parahaemolyticus* trên tôm tới 78,1% [74].



Hình 3.8. Hình ảnh TKT C1 (A) và TKT C2 (B) đã được tinh sạch với *V. alginolyticus* D1 làm ký chủ

3.2.2. Tuyển chọn thực khuẩn thể có đặc tính ly giải *Vibrio* tiềm năng

Để phát triển thành liệu pháp TKT thương mại, chủng TKT sử dụng phải có phổ ly giải rộng và đặc hiệu với *Vibrio* spp. Một TKT có phổ kí chủ rộng tiêu diệt nhiều chủng vi khuẩn *Vibrio*, tương đương với một loại kháng sinh phổ rộng. Do đó, các sản phẩm thương mại thường sử dụng nhiều dòng TKT khác nhau để tạo thành cocktail. Việc sàng lọc TKT tiềm năng được thực hiện trên 4 chủng vi khuẩn chủ phân lập A1.2, A2, D1, H3 và kết quả thể hiện ở Bảng 3.4.

Kết quả Bảng 3.4 cho thấy 7 chủng TKT có mức độ ly giải *Vibrio* khác nhau, thể hiện qua vết tan rõ hay mờ. Hiệu quả ly giải *Vibrio* sp. A1.2 và *V. alginolyticus* A2 của các thực khuẩn thể khá thấp, trong đó chỉ có TKT C1 và C2 có khả năng ly giải *Vibrio* sp. A1.2 và *V. alginolyticus* A2. Trái ngược, *V. alginolyticus* D1 và *V. paraheamolyticus* H3 khá nhạy cảm với 7 chủng TKT, điều này chứng minh 2 chủng D1 và H3 có thể là vi khuẩn chủ tiềm năng của TKT. Trong số 7 chủng nghiên cứu, chủng TKT C1 có hoạt tính ly giải mạnh và rộng với cả 4 vi khuẩn chủ sử dụng. Do vậy, TKT C1 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3.4. Sàng lọc thực khuẩn thể có phổ ly giải *Vibrio* ký chủ rộng

Vi khuẩn TKT	<i>Vibrio</i> sp. A1.2	<i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i> A2	<i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i> D1	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> H3
C1	++	++	++	++
C2	+	+	+	+
B1	-	-	+	-
B2	-	-	+	+
B3	-	-	-	+
B4	-	-	-	+
Q4	-	-	+	+

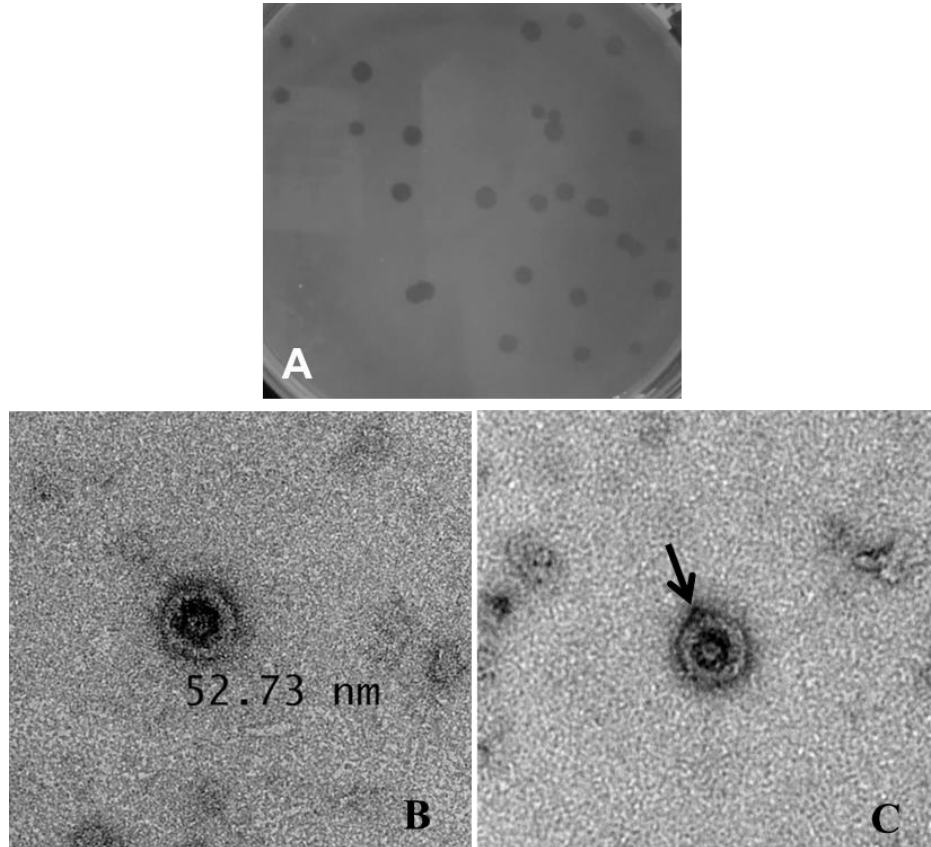
Chú thích: (-): Không có khả năng ly giải; (+): Khả năng ly giải ở mức độ trung bình; (++) : Hoạt tính ly giải ở mức độ mạnh

Phổ ly giải rộng và đặc hiệu cũng là đặc điểm được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Li và cộng sự (2021) đã phân lập được TKT vB_ValP_IME234 từ nước thải có khả năng ly giải cả 2 chủng *V. parahaemolyticus* và 4 chủng *V. alginolyticus* khác phân lập từ nước ngọt ở Bắc Kinh, Trung Quốc [75]. Hao và cộng sự (2023) đã phân lập được TKT VA5 có khả năng ly giải mạnh *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* [73]. Một thực khuẩn thể *Vibrio* mới vB_ValM_PVA8 (PVA8) thuộc họ *Straboviridae* có khả năng lây nhiễm hiệu quả các chủng *V. alginolyticus* và *V. parahaemolyticus* gây bệnh đã được phân lập từ nước thải. Sau khi xử lý bằng TKT, tỷ lệ sống của tôm ở nhóm đối chứng được cải thiện lên 88,89% (từ 34,43% ở nhóm đối chứng) [76]. Các minh chứng này chứng minh rằng TKT luôn có khả năng ly giải cả *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*.

3.2.3. Nghiên cứu đặc điểm hình thái của thực khuẩn thể

Đặc điểm hình thái là một tiêu chí quan trọng để phân loại TKT. Kết quả quan sát vết tan trên đĩa thạch hai lớp cho thấy TKT C1 có vết tan rõ, trong và có đường kính khoảng 3 mm với *V. parahaemolyticus* H3 là ký chủ

(Hình 3.9A). Thực khuẩn thể C1 được quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) có cấu trúc đầu đa diện với đường kính 52,73 nm và không phát hiện đuôi hoặc đuôi ngắn (Hình 3.9B).



Hình 3.9. Hình thái vết tan trên ký chủ *V. parahaemolyticus* H3 (A) và thực khuẩn thể C1 quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (B,C)

Trong các tài liệu khoa học được báo cáo trước đây, hơn 97% các TKT được xác định thuộc bộ *Caudovirales* [77]. Trong nghiên cứu này, kích thước đầu của TKT C1 nhỏ hơn so với TKT vB_ValP_IME234 (59 nm), vB_VpaS_OMN (55 nm), KIT05 (62,3 nm) [75, 78, 79]. Tuy nhiên, kích thước này lớn hơn kích thước đầu của TKT Vp33, Vp22, Vp21, Vp02 (41,28 - 50 nm) thuộc họ *Podoviridae* phân lập từ các mẫu hải sản [56].

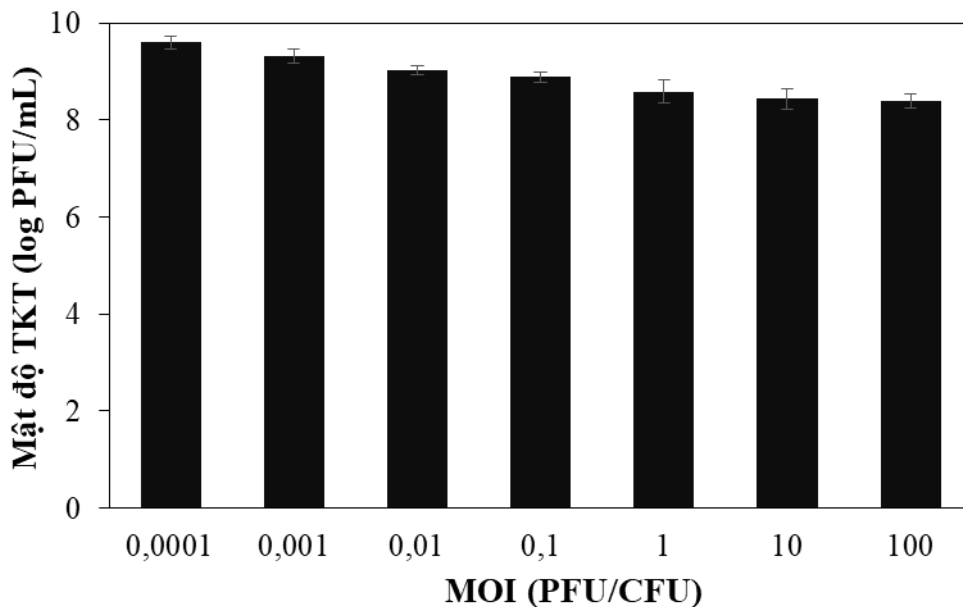
Các báo cáo gần đây cho thấy TKT họ *Podoviridae* khá phổ biến và cho hiệu quả ly giải vi khuẩn chủ cao [80]. Ngoài ra, các TKT thuộc họ *Siphoviridae* và họ *Myoviridae* cũng cho thấy tiềm năng cao trong ly giải các chủng *Vibrio* spp. Để phân loại chính xác, giải trình tự thế hệ mới và phân tích hệ gen của TKT C1 cần được tiến hành trong tương lai.

3.3. Đánh giá đặc tính ly giải vi khuẩn *Vibrio* của thực khuẩn thể C1

3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ lây nhiễm MOI tới khả năng ly giải của thực khuẩn thể C1

- Trên vi khuẩn chủ *V. parahaemolyticus* H3

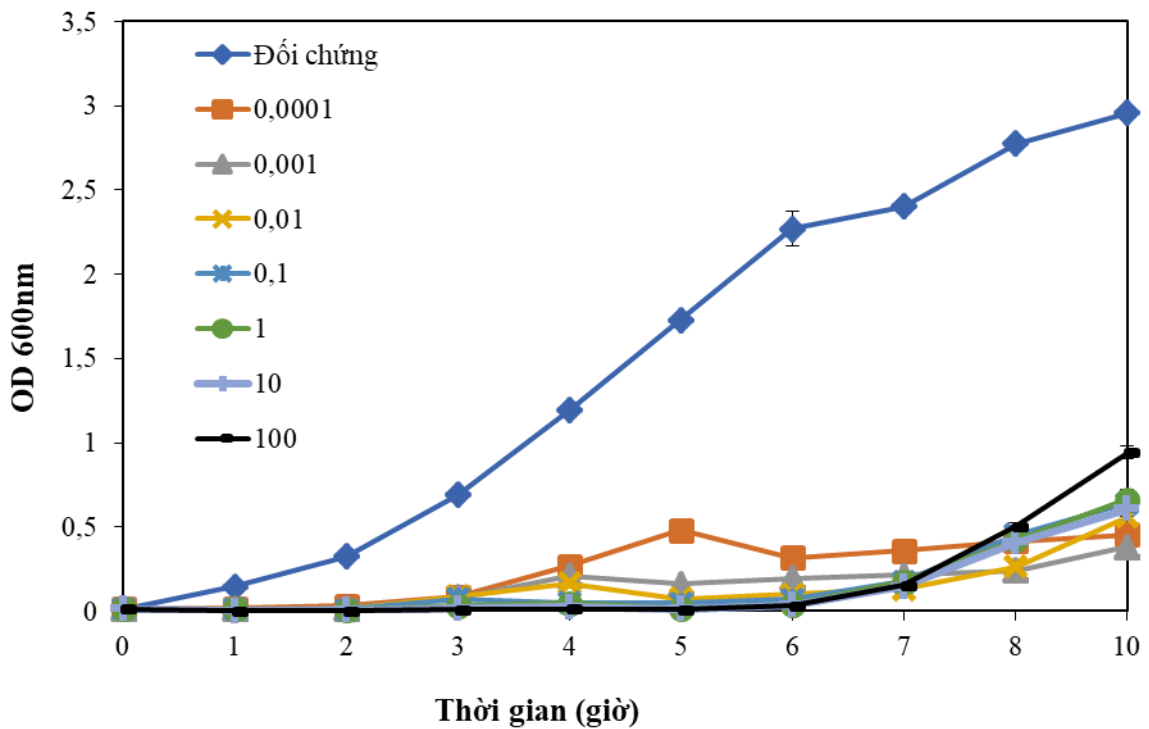
Hiệu quả của TKT trong việc ly giải vi khuẩn chủ là một trong những đặc tính quan trọng cần được xem xét để phát triển TKT thành liệu pháp. Tỉ lệ lây nhiễm (MOI) là tỷ lệ các tác nhân được hấp phụ, gắn hoặc lây nhiễm với các mục tiêu nhạy cảm. Tỷ lệ này sẽ thay đổi theo hàm số của số lượng tác nhân lây nhiễm, tốc độ bám dính của các tác nhân đó, thời gian cho phép để gắn kết và có bao nhiêu mục tiêu để gắn vào [53]. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện để xác định giá trị MOI thích hợp của TKT C1 và kết quả thể hiện ở Hình 3.10.



Hình 3.10. Mật độ TKT C1 trên chủng *V. parahaemolyticus* H3 ở các giá trị MOI khác nhau sau 10 giờ lây nhiễm

Từ Hình 3.10 cho thấy, không có sự khác biệt giữa hiệu quả lây nhiễm của TKT C1 trong việc lây nhiễm vật chủ ở MOI 0,1 và 0,01. Mật độ TKT C1 giảm dần khi tăng MOI tới 10 và 100 sau 10 giờ lây nhiễm. Đáng chú ý, tại MOI thấp nhất là 0,0001, mật độ của TKT C1 cao nhất, đạt $9,60 \pm 0,12$ log PFU/mL. Điều này chứng minh TKT C1 có khả năng tăng sinh mạnh và hiệu quả ly giải cao. Tại MOI 0,0001- 0,1, mật độ TKT dao động từ 8,8 - 9,60 log

PFU/mL. Trong nghiên cứu khác của Fu và cộng sự (2023) trên TKT PVA23 được phân lập từ nước thải có khả năng ly giải *V. alginolyticus* cho thấy TKT cũng có khả năng tăng sinh mạnh tại MOI thấp nhất 0,000001[57]. Trái ngược, TKT vB_VpS_BA3 và vB_VpS_CA8 phân lập từ nước thải có giá trị MOI trên *V. parahaemolyticus* là 0,1 [55].



Hình 3.11. Đường cong sinh trưởng biểu diễn hoạt tính ly giải chủng *V. parahaemolyticus* H3 của thực khuẩn thể C1 ở các MOI khác nhau

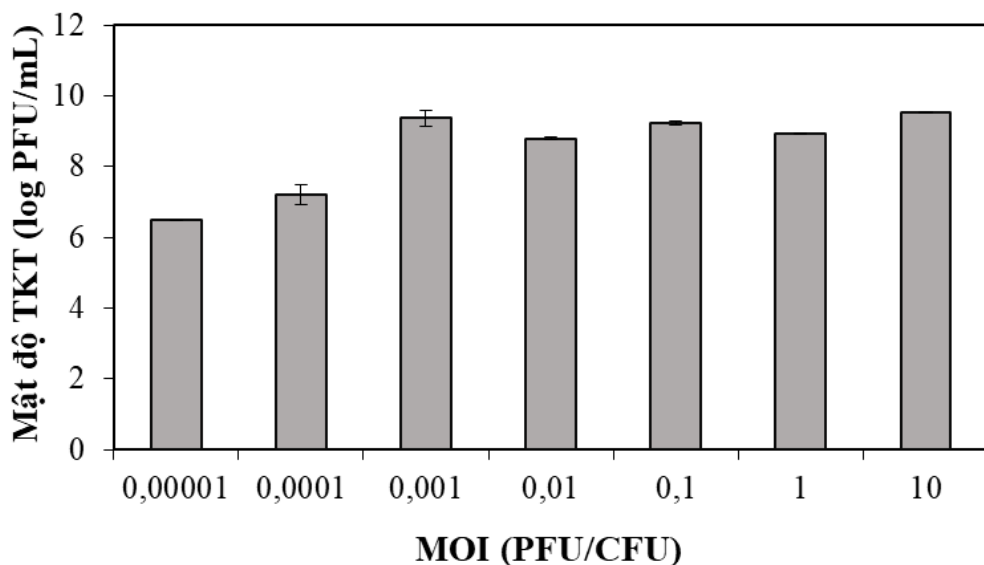
Tác dụng ức chế tăng trưởng của thực khuẩn thể C1 đối với vi khuẩn chủ được đánh giá bằng thử nghiệm ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* H3. *V. parahaemolyticus* H3 được nuôi cấy trong môi trường ASPW ở 37 °C và lây nhiễm ở các MOI khác nhau là 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 và 100. Từ kết quả Hình 3.11 cho thấy, sau khi lây nhiễm, sự phát triển chủng *V. parahaemolyticus* H3 bị ức chế đáng kể trong vòng 6 giờ đầu ở các MOI lớn hơn 0,1; các MOI còn lại ức chế trong 3 giờ và tái sinh sau đó. Mật độ tế bào được đo sau mỗi giờ cho thấy rằng *V. parahaemolyticus* H3 tái sinh tương đối chậm. Tại MOI 0,0001 và 0,001, vi khuẩn bị ức chế sinh trưởng trong 2 giờ đầu, sau đó tái sinh và đạt mật độ cao nhất sau 4- 5 giờ. Tóm lại, thực khuẩn thể C1 ức chế sự phát triển của *V. parahaemolyticus* H3 trong 6 giờ; sau đó, *V. parahaemolyticus* H3 tăng sinh trở lại, trong khi *V. parahaemolyticus* H3 ở

MOI 0,0001 tăng trưởng chậm. Đường cong sinh trưởng cho thấy TKT C1 có hiệu quả cao chống lại *V. parahaemolyticus* H3 ở tất cả các MOI được thử nghiệm sau 10 giờ lây nhiễm. Ban đầu, TKT ly giải một quần thể vi khuẩn, sau đó vi khuẩn tái phát triển. Mật độ TKT tăng sẽ dẫn đến sự kháng TKT của quần thể vi khuẩn do sự chọn lọc của các quần thể kháng TKT [81]. *V. parahaemolyticus* H3 có thể bị C1 ly giải trong một thời gian ngắn do thời gian tiềm tàng ngắn của TKT.

- Trên vi khuẩn chủ *V. alginolyticus* D1

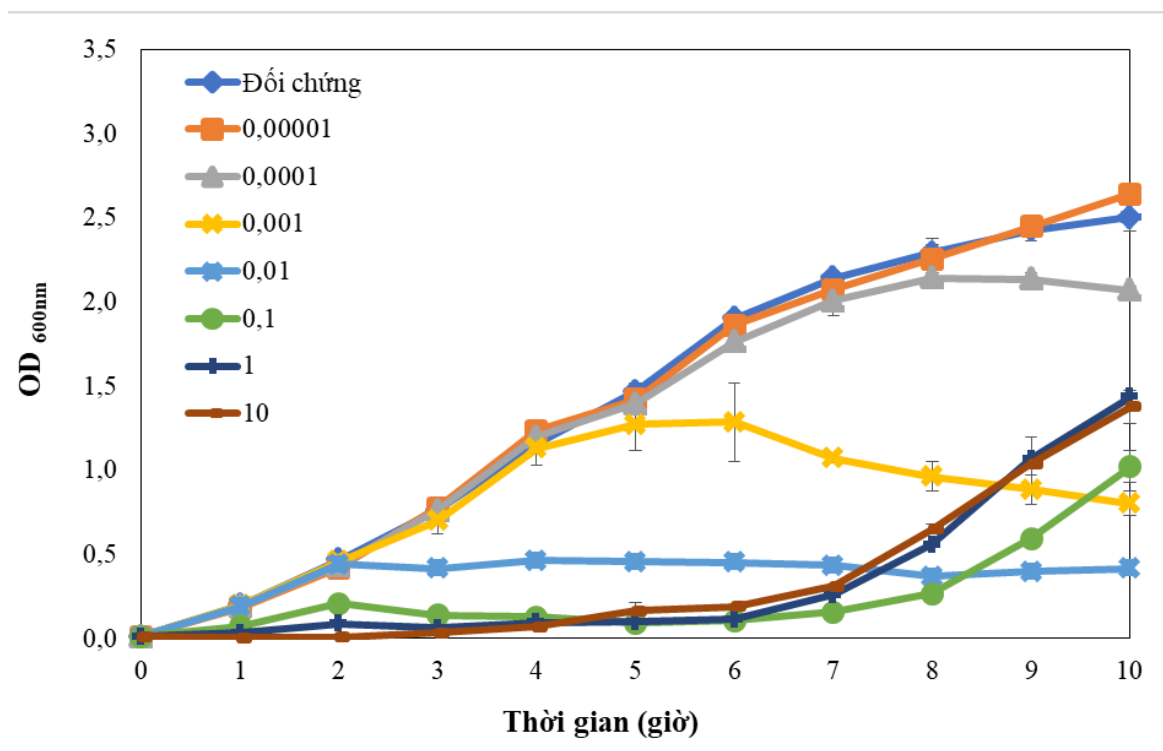
Phương pháp xác định MOI tối ưu của TKT C1 trên vi khuẩn ký chủ *V. alginolyticus* D1 cũng được thực hiện tương tự như *V. parahaemolyticus* H3. Chủng *V. alginolyticus* D1 được nuôi cấy trong môi trường ASPW ở 37°C và lây nhiễm ở các MOI khác nhau là 0,00001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 và 10 và kết quả thể hiện ở Hình 3.12.

Từ Hình 3.12 cho thấy, hiệu quả lây nhiễm của TKT C1 trong việc lây nhiễm vật chủ ở các MOI khác nhau là khác nhau. Tại MOI 0,00001-10, mật độ TKT dao động từ 6,487 - 9,532 log PFU/mL. Mật độ TKT C1 cao nhất tại MOI 0,001 và 10, đạt lần lượt $9,373 \pm 0,218$ log PFU/mL và $9,532 \pm 0,013$ log PFU/mL, tương ứng. Tại MOI thấp nhất 0,00001, mật độ TKT là 6,487 log PFU/mL. Điều này chứng minh TKT C1 có khả năng tăng sinh mạnh và hiệu quả ly giải cao trên *V. alginolyticus* D1.



Hình 3.12. Mật độ TKT C1 trên chủng *V. alginolyticus* D1 ở các giá trị MOI khác nhau sau 10 giờ lây nhiễm

Trong các nghiên cứu của Li và cộng sự (2019), TKT IME271 phân lập từ nước biển và TKT IME234 phân lập từ nước thải (2021) đều có giá trị MOI tối ưu trên vi khuẩn ký chủ *V. alginolyticus* 1651 là 0,01 [75, 82]. Trong nghiên cứu của Fu và cộng sự (2022), TKT PVA23 có khả năng ly giải *V. alginolyticus* VA15 ($4,26 \times 10^{12}$ PFU/mL) và TKT PVA8 có khả năng ly giải *V. alginolyticus* VA10 ($2,79 \times 10^{12}$ PFU/mL) với giá trị MOI 0,001. Bên cạnh đó, tại MOI thấp nhất là 0,000001 trên TKT PVA23 hay 0,000001 trên TKT PVA8, mật độ hai TKT này thu được lớn bởi vì chúng có khả năng tăng sinh mạnh [57, 76].



Hình 3.13. Đường cong sinh trưởng biểu diễn hoạt tính ly giải chủng *V. alginolyticus* D1 của thực khuẩn thể C1 ở các MOI khác nhau

Từ kết quả Hình 3.13 cho thấy, sau khi lây nhiễm, chủng *V. alginolyticus* D1 bị ức chế đáng kể sự phát triển trong vòng 6 giờ đầu ở các MOI lớn hơn 0,01, các MOI còn lại không bị ức chế hoặc ức chế yếu. Mật độ tế bào được đo sau 10 giờ và thấy rằng *V. alginolyticus* D1 tái sinh tương đối chậm. Tương tự như trên chủng vi khuẩn ký chủ *V. parahaemolyticus* H3, ở các giá trị MOI cao hơn 0,1, vi khuẩn ký chủ *V. alginolyticus* D1 bị ức chế sinh trưởng mạnh trong 7 giờ đầu và tái sinh mạnh sau đó. Tại MOI 0,001, mật độ vi khuẩn tăng mạnh trong 4 giờ đầu (không có khác biệt so với đối

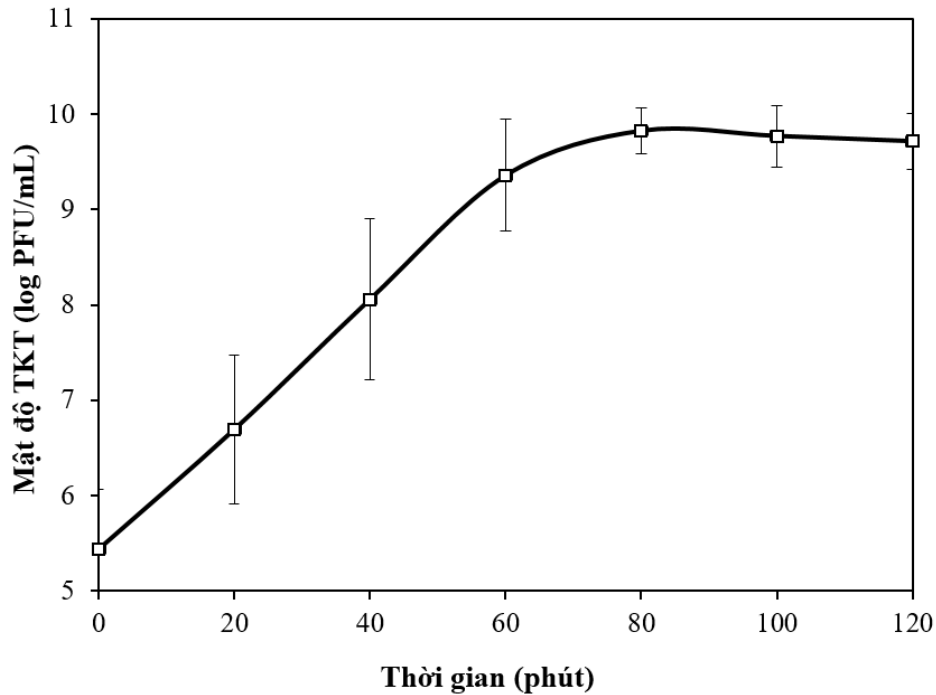
chúng), sau đó tốc độ sinh trưởng chậm lại và giảm dần sau 6 giờ lây nhiễm.

Tóm lại, tại các MOI khác nhau, sự phát triển của *V. alginolyticus* D1 bị ức chế bởi thực khuẩn thể C1 là khác nhau; *V. alginolyticus* D1 ở MOI 0,01 bước vào giai đoạn cân bằng ngay sau 2 giờ đầu. Đường cong sinh trưởng vi khuẩn cho thấy TKT C1 có hiệu quả cao ức chế *V. alginolyticus* D1 ở các MOI lớn hơn 0,001 sau 10 giờ lây nhiễm, mật độ TKT tăng sẽ dẫn đến sự kháng TKT của quần thể vi khuẩn do sự chọn lọc của các quần thể kháng TKT. Kết hợp kết quả mật độ TKT ($8,787 \pm 0,039 \log \text{PFU/mL}$) và đường cong sinh trưởng của vi khuẩn ký chủ, MOI tối ưu của TKT C1 ly giải *V. alginolyticus* D1 là 0,01.

3.3.2. Đường cong sinh trưởng đơn bậc của TKT C1

Do *V. parahaemolyticus* gây bệnh chính trên tôm nước lợ, chủng *V. parahaemolyticus* H3 được sử dụng làm ký chủ cho những đánh giá sâu hơn về đặc tính ly giải của TKT C1. Trong thí nghiệm này, TKT C1 được ủ với *V. parahaemolyticus* H3 đầu giai đoạn log với MOI là 0,001 PFU/CFU và đường cong sinh trưởng đơn bậc đã được xây dựng nhằm mục đích tìm ra thời điểm thu nhận TKT cho hiệu suất cao nhất. Thí nghiệm được lặp lại ba lần và kết quả thể hiện ở Hình 3.14.

Thời kỳ tiềm tàng là thời gian tối thiểu từ khi hấp phụ TKT đến trước khi TKT ly giải vật chủ và giải phóng các virion thế hệ con cháu. Từ biểu đồ cho thấy khoảng thời kỳ tiềm tàng của TKT C1 ngắn, chỉ dưới 10 phút (Hình 3.14). Hệ số nhân vi rút (burst size) là số lượng virion thế hệ trung bình được giải phóng bởi một tế bào chủ bị lây nhiễm khi hoàn thành chu kỳ tăng trưởng. Hệ số nhân vi rút lớn được coi là một trong những đặc điểm chính của thực khuẩn thể có hiệu quả như tác nhân kháng khuẩn, liên quan chặt chẽ đến khả năng lây truyền của thực khuẩn thể. Một thực khuẩn thể có hệ số nhân vi rút lớn có lợi thế thực tế trong trị liệu vì quần thể thực khuẩn thể có thể tăng liều ban đầu lên vài trăm lần trong một khoảng thời gian ngắn [83].



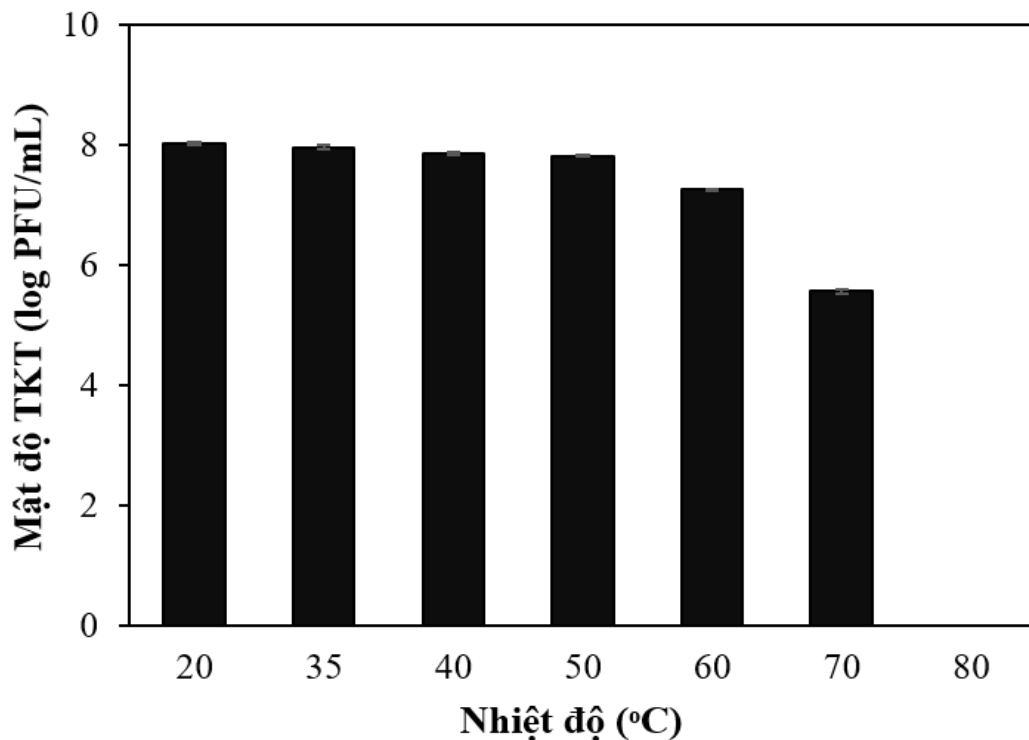
Hình 3.14. Đường cong sinh trưởng đơn bậc của TKT C1

Từ công thức trên, hệ số nhân vi rút của TKT C1 được xác định là 294 PFU/tế bào xâm nhiễm, cao hơn đáng kể so với hệ số được quan sát thấy ở hầu hết các TKT ly giải *V. parahaemolyticus* khác (≤ 100 PFU/tế bào xâm nhiễm) như TKT PG07 (60 PFU/tế bào xâm nhiễm) với thời kì tiềm tàng ngắn (10 phút), pha sinh trưởng kéo dài (170 phút), TKT vB_VpS_BA3 và vB_VpS_CA8 đều có thời kì tiềm tàng ngắn và hệ số nhân vi rút khoảng 100 PFU/tế bào xâm nhiễm, hay 6 TKT được phân lập từ các mẫu hải sản có hệ số nhân vi rút dao động từ 17-51 PFU/tế bào xâm nhiễm với thời kì tiềm tàng ngắn (10 đến 20 phút) [51, 55, 56]. Liang và cộng sự (2022) đã phân lập được TKT vB_VpaP_GHSM17 có thời kì tiềm tàng dài 20 phút, pha tăng sinh kéo dài 100 phút và có hệ số nhân vi rút là 316 PFU/tế bào xâm nhiễm [54]. Cao và cộng sự (2021) đã phân lập được TKT MGD2 có khả năng kiểm soát sinh học chống lại *V. parahaemolyticus* đa kháng thuốc có thời kì tiềm tàng ngắn (10 phút), pha tăng sinh dài 40 phút và hệ số nhân vi rút là 244 PFU/tế bào xâm nhiễm [59]. Trong nghiên cứu khác, Yin và cộng sự (2019) đã phân lập được ba TKT *V. parahaemolyticus* ϕ V05, ϕ V07 và ϕ V09 từ nước bề mặt sông Trường Giang, Thượng Hải có hệ số nhân vi rút lần lượt là 571 PFU/tế bào xâm nhiễm, 458 PFU/tế bào xâm nhiễm và 593 PFU/tế bào xâm nhiễm. Trong đó, thời kì tiềm tàng của các TKT tương đối ngắn (15 phút) và pha tăng

sinh dao động nhỏ (30-40 phút) tùy từng TKT [80]. Mặc dù ba TKT *V. parahaemolyticus* có hệ số nhân vi rút lớn hơn, nhưng hệ số nhân vi rút của TKT C1 nói chung là tương đối lớn, thời kì tiềm tàng ngắn và có tác dụng ly giải mạnh đối với *V. parahaemolyticus* H3.

3.3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự ổn định của thực khuẩn thể C1

Nhiệt độ là một trong các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình gắn, xâm nhập, nhân lên của TKT trong tế bào vật chủ. Nhiều nghiên cứu chứng minh giai đoạn tiềm tàng bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ cao, trong khi đó sự xâm nhập của TKT bị cản trở bởi nhiệt độ thấp. Bên cạnh đó, TKT có phổ hoạt động rộng ở dải nhiệt có nhiều tiềm năng phát triển chế phẩm vi sinh sau này. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự ổn định của TKT được tiến hành và kết quả thể hiện ở Hình 3.15.



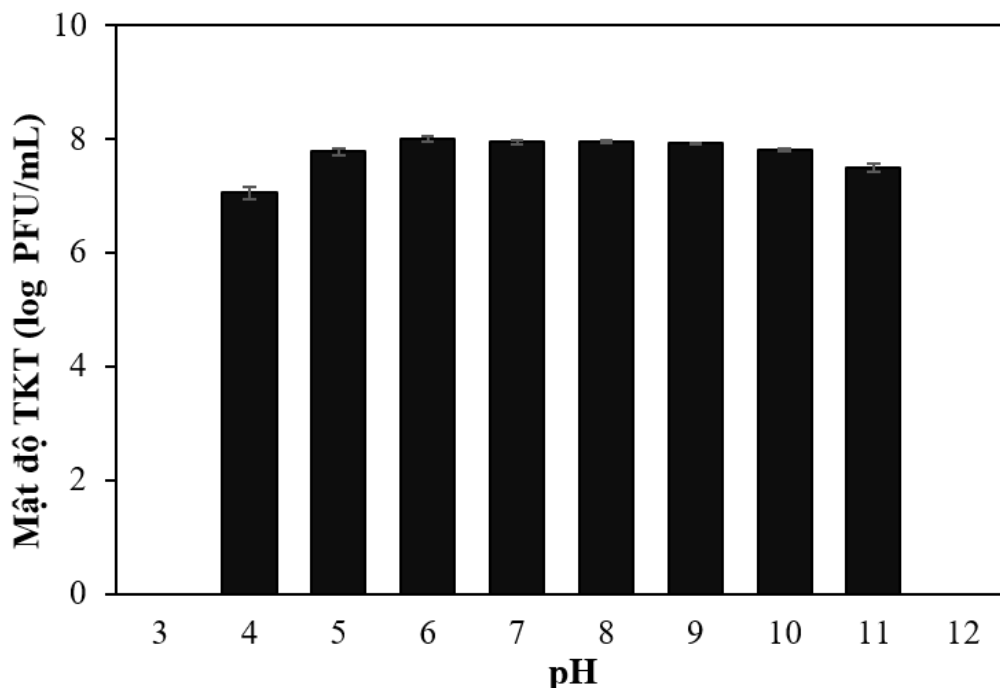
Hình 3.15. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự ổn định của TKT C1

Từ biểu đồ Hình 3.15 cho thấy, TKT C1 có dải nhiệt độ hoạt động khá rộng từ 20-70°C. Không có sự khác biệt rõ rệt được ghi nhận ở nhiệt độ từ 20-50°C (7,8-8 log PFU/mL). Tăng nhiệt độ tới 60°C làm giảm nhẹ mật độ TKT C1 (7,256± 0,006 log PFU/mL). Việc ủ ở nhiệt độ hơn 70°C làm mật độ TKT chỉ còn 5,563± 0,036 log PFU/mL. Đặc biệt, TKT C1 ức chế hoàn toàn ở

nhệt độ 80°C. Kết quả trên hoàn toàn phù hợp với kết quả được báo cáo trong nghiên cứu của Liang và cộng sự (2022). Kết quả cho thấy TKT ly giải *V. paraheamolyticus* vB_VpaP_GHSM17 có hoạt tính ổn định ở nhiệt độ dưới 60°C và bị bất hoạt hoàn toàn ở nhiệt độ 80°C [54]. Trong nghiên cứu khác của Ren và cộng sự (2022), TKT S1R3Y ly giải ký chủ *V. alginolyticus* phân lập từ mẫu nước thải được thu thập tại chợ hải sản ở Đại Liên, tỉnh Liêu Ninh, Trung Quốc bị bất hoạt hoàn toàn ở nhiệt độ trên 70°C [84]. Năm 2023, Xu và cộng sự đã nghiên cứu đánh giá sự ổn định của TKT vB_VpaP_SJSY21 phân lập từ nước thải của chợ hải sản ở Tam Á, Trung Quốc và thấy rằng mật độ TKT này ổn định ở nhiệt độ dưới 80°C [85].

3.3.4. Ảnh hưởng của pH tới sự ổn định của thực khuẩn thể C1

Mỗi TKT đều có độ pH tối ưu cho sự sống và các hoạt động sinh học. pH có vai trò quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của TKT và vi khuẩn ký chủ. pH tối ưu sẽ nâng cao khả năng ly giải vi khuẩn chủ của TKT. Trong nghiên cứu này, sự ổn định của TKT C1 được đánh giá trên dải pH từ 3-12. Kết quả đánh giá được thể hiện ở Hình 3.16.



Hình 3.16. Ảnh hưởng của pH tới sự ổn định của thực khuẩn thể C1

Kết quả Hình 3.16 cho thấy TKT C1 duy trì hoạt động ở dải pH rộng, từ pH 4 – pH 11, tỉ lệ sống sót dao động từ 88,21-100%. Trong đó, mật độ

TKT gần như không thay đổi ($\sim 8 \log \text{PFU/mL}$) ở dải pH 6 - 9. Khi độ pH giảm xuống 4, hoạt động của TKT C1 giảm đáng kể, chỉ còn $7,057 \pm 0,106 \log \text{PFU/mL}$. TKT C1 bị bất hoạt hoàn toàn ở pH 3. Khi độ pH tăng tới 11, mật độ TKT C1 giảm nhẹ ($7,497 \pm 0,072 \log \text{PFU/mL}$) so với pH 9 ($7,926 \pm 0,013 \log \text{PFU/mL}$) và bất hoạt hoàn toàn ở pH 12.

Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Liang và cộng sự (2022) cho thấy TKT vB_VpaP_GHSM17 trên *V. paraheamolyticus* không thay đổi nhiều về mật độ ở dải pH 5 - 11 [54]. Năm 2020, nhóm tác giả Yang và cộng sự nghiên cứu khả năng ly giải của TKT vB_VpS_BA3 có khả năng ly giải *V. paraheamolyticus* và cho thấy TKT này hoạt động tốt trong dải pH 5-10 và mật độ giảm ở pH thấp hoặc cao hơn dải trên [55]. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Tan và cộng sự (2021) trên 6 dòng TKT phân lập được có khả năng ly giải *V. paraheamolyticus*. Kết quả cho thấy các thực khuẩn thể được quan sát này có khả năng chịu được độ pH trong dải từ 5 đến 11 với tỷ lệ sống sót dao động từ 95,82 - 99,92% [56]. Do đó, có thể thấy rằng thực khuẩn thể có thể duy trì ổn định dưới các áp lực môi trường khác nhau, tạo điều kiện thuận lợi đối với liệu pháp thể thực khuẩn trong môi trường nước nuôi trồng thủy sản [86].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phân lập và định danh được 4 chủng vi khuẩn trên mẫu tôm bệnh bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA kết hợp với các đặc điểm hình thái và hóa sinh, bao gồm *V. alginolyticus* D1 và *V. paraheamolyticus* H3, *Vibrio* sp. A1.2 và *V. alginolyticus* A2.
2. Đã sàng lọc được chủng thực khuẩn thể C1 có phổ ly giải rộng và mạnh với cả 4 chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ 7 thực khuẩn thể thuần được phân lập trên 30 mẫu bùn và nước ao. Thực khuẩn thể C1 có cấu trúc đầu đa diện với đường kính 52,73 nm.
3. Đã xác định được một số đặc tính ly giải của TKT C1 trên vi khuẩn ký chủ *V. paraheamolyticus* H3, bao gồm: MOI tối ưu là 0,0001; thời gian tiềm tàng kéo dài khoảng 10 phút; giải phóng lượng thực khuẩn thể mới trung bình đạt 294 PFU/tế bào xâm nhiễm; ổn định ở nhiệt độ 20 - 50°C; chịu dải pH rộng từ 5 – 11 và tối ưu nhất ở pH 6 – 9.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu thu được trong đề tài, tác giả kiến nghị sử dụng công nghệ giải trình tự hệ gen thế hệ mới để nghiên cứu đặc điểm hệ gen, phân loại và các gen chức năng liên quan đến cơ chế lây nhiễm của thực khuẩn thể C1.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục Thủy sản, 2023, Ngành tôm Việt Nam đặt mục tiêu sản lượng đạt 1 triệu tấn năm 2023. <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn/tin-tuc/nghe-ca-trong-nuoc/doc-tin/019524/2023-08-21/nganh-tom-viet-nam-dat-muc-tieu-san-luong-dat-1-trieu-tan-nam-2023>
2. Amatul-Samahah M.A., Omar W.H.H.W., Ikhsan N.F.M., Azmai M.N.A., Zamri-Saad M., Ina-Salwany M.Y., 2020, Vaccination trials against vibriosis in shrimp: A review. *Aquaculture Reports*. 18: pp. 100471.
3. Mohamad N., Amal M.N.A., Yasin I.S.M., Saad M.Z., Nasruddin N.S., Al-saari N., Mino S., Sawabe T., 2019, Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *J Aquaculture International*. 512: pp. 734289.
4. Yang F., Xu L., Huang W., Li F., 2022, Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae. *J Aquaculture International*. 548: pp. 737605.
5. Butt U.D., Lin N., Akhter N., Siddiqui T., Li S., Wu B., 2021, Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish Shellfish Immunology*. 114: pp. 263-281.
6. de Souza Valente C., Wan A.H.L., 2021, *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*. 181: pp. 107527.
7. Lee C.T., Chen I.T., Yang Y.T., Ko T.P., Huang Y.T., Huang J.Y., Huang M.F., Lin S.J., Chen C.Y., Lin S.S., 2015, The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(34): pp. 10798-10803.
8. Prachumwat A., Wechprasit P., Srisala J., Kriangsaksri R., Flegel T.W., Thitamadee S., Sritunyalucksana K., 2020, *Shewanella khirikhana* sp. nov.—a shrimp pathogen isolated from a cultivation pond exhibiting early mortality syndrome. *J Microbial biotechnology*. 13(3): pp. 781-795.
9. Thitamadee S., Prachumwat A., Srisala J., Jaroenlak P., Salachan P.V., Sritunyalucksana K., Flegel T.W., Itsathitphaisarn O., 2016, Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *J Aquaculture Reports*. 452: pp. 69-87.
10. Somboon M., Purivirojkul W., Limsuwan C., Chuchird N., 2012, Effect of *Vibrio* spp. in white feces infected shrimp in Chantaburi, Thailand. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*. 36(1): pp. 7-15.
11. Trương Minh Út, Lê Minh Khôi, Nguyễn Trọng Nghĩa, Lý Thị Ngọc Duyên, Từ Thanh Dung, 2021, Xác định khả năng gây bệnh phân trắng của vi khuẩn *Vibrio* spp. phân lập trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus*

- vannamei*) ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. *Tap chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 8(129): pp. 125-132.
12. Limsuwan C., 2010, White Feces Disease in Thailand. *Boletines nicovita magazine*. 36(1): pp. 2-4.
 13. Durai V., Gunalan B., Johnson P.M., Maheswaran M., Pravinkumar M., 2015, Effect on white gut and white feces disease in semi intensive *Litopenaeus vannamei* shrimp culture system in south Indian state of Tamilnadu. *International Journal of Marine Science*. 5(14).
 14. Farmer Iii J.J., Michael Janda J., Brenner F.W., Cameron D.N., Birkhead K.M., *Vibrio*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea Bacteria. 2015: John Wiley & Sons, Ltd. 1-79.
 15. Bentivoglio M., Pacini P., 1995, Filippo Pacini: a determined observer. *Brain research bulletin*. 38(2): pp. 161-165.
 16. Whitman W.B., Rainey F., Kämpfer P., Trujillo M., Chun J., DeVos P., Hedlund B., Dedysh S., *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Vol. 410. 2015: Wiley Online Library.
 17. Wang Y.L., Gu J.D., 2005, Influence of temperature, salinity and pH on the growth of environmental *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from Mai Po and the Inner Deep Bay Nature Reserve Ramsar Site of Hong Kong. *J Basic Microbiol*. 45(1): pp. 83-93.
 18. Bùi Quang Tề, 2006, Bệnh học thủy sản. NXB Bắc Ninh.
 19. Vezzulli L., Colwell R.R., Pruzzo C., 2013, Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. *J Microbial ecology*. 65: pp. 817-825.
 20. Gao S., Pan L., Huang F., Song M., Tian C., Zhang M., 2019, Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 499: pp. 109-118.
 21. OIE, 2018, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Chapter 2.2.1. Acute hepatopancreatic necrosis diseases
 22. Bamel K., Gulati R., Khushbu P.S., Bamel K., *Vibriosis in shrimps*. 2022, Bhumi Publishing, India. p. 158-164.
 23. Chellapandian H., Sivakamavalli J., Anand A.V., Balasubramanian B., *Challenges in controlling vibriosis in shrimp farms*. Infections sepsis development. Vol. 195. 2021: IntechOpen.
 24. Gordillo Altamirano F.L., Barr J.J., 2019, Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical microbiology reviews*. 32(2): pp. 10.1128/cmr.00066-18.
 25. Huang Y., Wang W., Zhang Z., Gu Y., Huang A., Wang J., Hao H., 2022, Phage products for fighting antimicrobial resistance. *Microorganisms*. 10(7): pp. 1324.
 26. Hankin E., 1896, L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera. *Ann Inst Pasteur*. 10: pp. 511.

27. d'Herelle M.F., 1961, Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Acta Kravsi*.
28. Wittebole X., De Roock S., Opal S.M., 2014, A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *J Virulence*. 5(1): pp. 226-235.
29. Buttimer C., McAuliffe O., Ross R.P., Hill C., O'Mahony J., Coffey A., 2017, Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology*. 8: pp. 212667.
30. Obradovic A., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Jackson L.E., Balogh B., Guven K., Iriarte F.B., 2005, Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease*. 89(7): pp. 712-716.
31. Kim K.H., Ingale S.L., Kim J.S., Lee S.H., Lee J.H., Kwon I.K., Chae B.J., 2014, Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective. *Animal Feed Science Technology*. 196: pp. 88-95.
32. Lone A., Anany H., Hakeem M., Aguis L., Avdjian A.C., Bouget M., Atashi A., Brovko L., Rochefort D., Griffiths M.W., 2016, Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 217: pp. 49-58.
33. Ackermann H.W., 2009, Phage classification and characterization. *Bacteriophages: Methods and protocols, volume 1: Isolation, characterization, and interactions*: pp. 127-140.
34. Young R.Y., 1992, Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiological reviews*. 56(3): pp. 430-481.
35. Dion M.B., Oechslin F., Moineau S., 2020, Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*. 18(3): pp. 125-138.
36. Hay I.D., Lithgow T., 2019, Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO reports*. 20(6): pp. e47427.
37. Krupovic M., ICTV Report Consortium, 2018, ICTV virus taxonomy profile: *Plasmaviridae*. *Journal of General Virology*. 99(5): pp. 617-618.
38. Young R.Y., Wang N., Roof W.D., 2000, Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in microbiology*. 8(3): pp. 120-128.
39. Echols H., 1972, Developmental pathways for the temperate phage: lysis vs lysogeny. *Annu Rev Genet*. 6(1): pp. 157-190.
40. Łoś M., Węgrzyn G., 2012, Pseudolysogeny. *Advances in Virus Research*. 82: pp. 339-349.
41. Wu J.L., Lin H.M., Jan L., Hsu Y.L., Chang L.H., 1981, Biological control of fish bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila*, by bacteriophage AH 1. *Fish pathology*. 15(3-4): pp. 271-276.

42. Higuera G., Bastías R., Tsertsvadze G., Romero J., Espejo R.T., 2013, Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 392: pp. 128-133.
43. Kalatzis P.G., Bastías R., Kokkari C., Katharios P., 2016, Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. *PloS one*. 11(3): pp. e0151101.
44. Vinod M.G., Shivu M.M., Umesha K.R., Rajeeva B.C., Krohne G., Karunasagar I., Karunasagar I., 2006, Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*. 255(1-4): pp. 117-124.
45. Karunasagar I., Shivu M.M., Girisha S.K., Krohne G., Karunasagar I., 2007, Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture*. 268(1-4): pp. 288-292.
46. Zhang J., Cao Z., Li Z., Wang L., Li H., Wu F., Jin L., Li X., Li S., Xu Y., 2015, Effect of bacteriophages on *Vibrio alginolyticus* infection in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Journal of the World Aquaculture Society*. 46(2): pp. 149-158.
47. Stalin N., Srinivasan P., 2017, Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Veterinary Microbiology*. 207: pp. 83-96.
48. Alagappan K., Karuppiyah V., Deivasigamani B., 2016, Protective effect of phages on experimental *V. parahaemolyticus* infection and immune response in shrimp (Fabricius, 1798). *Aquaculture*. 453: pp. 86-92.
49. Lomelí-Ortega C.O., Martínez-Díaz S.F., 2014, Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*. 434: pp. 208-211.
50. Jun J.W., Han J.E., Giri S.S., Tang K.F.J., Zhou X., Aranguren L.F., Kim H.J., Yun S., Chi C., Kim S.G., 2018, Phage application for the protection from acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei*. *Indian journal of microbiology*. 58: pp. 114-117.
51. Ding T., Sun H., Pan Q., Zhao F., Zhang Z., Ren H., 2020, Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage vB_VpaS_PG07. *Virus research*. 286: pp. 198080.
52. Chatain-Ly M.H., 2014, The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*. 5: pp. 74029.
53. Abedon S.T., Bartom E., 2013, Multiplicity of infection, in Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition. Elsevier Inc. p. 509-510.
54. Liang X., Wang Y., Hong B., Li Y., Ma Y., Wang J., 2022, Isolation and Characterization of a Lytic *Vibrio parahaemolyticus* Phage vB_VpaP_GHSM17 from Sewage Samples. *Viruses*. 14(8): pp. 1601.

55. Yang M., Huang S., Zhang J., Wu Q., 2020, Isolation and characterization of the novel phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for lysing *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. 11: pp. 498650.
56. Tan C.W., Rukayadi Y., Hasan H., Hara H., Thung T.Y., Lee E., 2021, Isolation and characterization of six *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophages from seafood samples. *Frontiers in Microbiology*. 12: pp. 616548.
57. Fu J., Li Y., Zhao L., Wu C., He Z., 2022, Characterization and genomic analysis of a bacteriophage with potential in lysing *Vibrio alginolyticus*. *Viruses*. 15(1): pp. 135.
58. Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A., 2011, The influence of external factors on bacteriophages. *Folia microbiologica*. 56: pp. 191-200.
59. Cao Y., Zhang Y., Lan W., Sun X., 2021, Characterization of vB_VpaP_MGD2, a newly isolated bacteriophage with biocontrol potential against multidrug-resistant *Vibrio parahaemolyticus*. *Archives of Virology*. 166: pp. 413-426.
60. Trương Thị Bích Vân, Nguyễn Thị Cẩm Ly, Lê Hoàng Bảo Ngọc, Phan Trần Học Khang, Phạm Hoài An, Trần Văn Bé Năm, 2021, Hiệu quả ứng dụng thực khuẩn thể trong điều trị bệnh do vi khuẩn *Vibrio parahemolyticus* gây ra trên Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển Nông thôn*: pp. 163-169.
61. Vo Thi Tu Anh, Pham-Khanh Nguyen Huan, Nguyen Song Han, Sunahara H., Dai Thi Xuan Trang, Kamei K., 2023, Isolation, characterization, and complete genome sequence of vibrio phage KIT04, a novel lytic phage of the subfamily *Ermolyevavirinae*. *Virology*. 579: pp. 148-155.
62. Le Hoang Bao Ngoc, Le Viet Dung, Tran Thi Lieu, Trương Thị Bích Vân, 2024, Effect of bacteriophage on histopathology and disease resistance of Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected by *Vibrio parahaemolyticus*. *Veterinary Integrative Sciences*. 22(2): pp. 511-523.
63. Wang R.X., Wang J.Y., Sun Y.C., Yang B.L., Wang A.L., 2015, Antibiotic resistance monitoring in *Vibrio* spp. isolated from rearing environment and intestines of abalone *Haliotis diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin*. 101(2): pp. 701-706.
64. Jones J.L., Lüdeke C.H.M., Bowers J.C., Garrett N., Fischer M., Parsons M.B., Bopp C.A., DePaola A., 2012, Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of clinical microbiology*. 50(7): pp. 2343-2352.
65. Chu Văn Mẫn, 2011, Tin học trong Công nghệ Sinh học. NXB Giáo dục Việt Nam.

66. Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P., 2009, Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions*: pp. 69-76.
67. Brady J.E., Holum J.R., *Chemistry: the study of matter and its changes*. 1993: John Wiley & Sons Incorporated.
68. Gopal S., Otta S.K., Kumar S., Karunasagar I., Nishibuchi M., Karunasagar I., 2005, The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 102(2): pp. 151-159.
69. Soto-Rodriguez S.A., Gomez-Gil B., Lozano-Olvera R., Betancourt-Lozano M., Morales-Covarrubias M.S., 2015, Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied Environmental Microbiology*. 81(5): pp. 1689-1699.
70. Joshi J., Srisala J., Truong V.H., Chen I.T., Nuangsaeng B., Suthienkul O., Lo C.F., Flegel T.W., Sritunyalucksana K., Thitamadee S., 2014, Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 428: pp. 297-302.
71. López-León P., Luna-González A., Escamilla-Montes R., del Carmen Flores-Miranda M., Fierro-Coronado J.A., Álvarez-Ruiz P., Diarte-Plata G., 2016, Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Latin American Journal of Aquatic Research*. 44(3): pp. 470-479.
72. Hossain M.M.M., Tanni L.N., Rahman M.A., Farjana M., Moon R.S., Tonni N.Z., Mekat M.R., Mojumdar S., Rahman N., Sen B.K., 2024, Bacteriophage and non-pathogenic *Vibrio* to control diseases in shrimp aquaculture. *Comparative Immunology Reports*. 6: pp. 200126.
73. Hao Q., Bai Y., Zhou H., Bao X., Wang H., Zhang L., Lyu M., Wang S., 2023, Isolation and Characterization of Bacteriophage VA5 against *Vibrio alginolyticus*. *Microorganisms*. 11(12): pp. 2822.
74. Dubey S., Singh A., Kumar B.T.N., Singh N.K., Tyagi A., 2021, Isolation and characterization of bacteriophages from inland saline aquaculture environments to control *Vibrio parahaemolyticus* contamination in shrimp. *Indian Journal of Microbiology*. 61: pp. 212-217.
75. Li F., Tian F., Li J., Li L., Qiao H., Dong Y., Ma F., Zhu S., Tong Y., 2021, Isolation and characterization of a podovirus infecting the opportunist pathogen *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Virus Research*. 302: pp. 198481.

76. Fu J., Li Y., Zhao L., 2023, Characterization of vB_ValM_PVA8, a broad-host-range bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. 14: pp. 1105924.
77. Turner J.W., Paranjpye R.N., Landis E.D., Biryukov S.V., Gonzalez-Escalona N., Nilsson W.B., Strom M.S., 2013, Population structure of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* from the Pacific Northwest coast of the United States. *PLoS One*. 8(2): pp. e55726.
78. Zhang H., Yang Z., Zhou Y., Bao H., Wang R., Li T., Pang M., Sun L., Zhou X., 2018, Application of a phage in decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. *International Journal of Food Microbiology*. 275: pp. 24-31.
79. Vo Thi Tu Anh, Nguyen Huan Pham-Khanh, Nguyen Song Han, Sunahara H., Kamei K., 2022, Characterization and complete genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus*-infecting phage KIT05. *Current Microbiology*. 79(8): pp. 221.
80. Yin Y., Liu D., Yang S., Almeida A., Guo Q., Zhang Z., Deng L., Wang D., 2019, Bacteriophage potential against *Vibrio parahaemolyticus* biofilms. *Food Control*. 98: pp. 156-163.
81. Oechslin F., 2018, Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 10(7): pp. 351.
82. Li F., Xing S., Fu K., Zhao S., Liu J., Tong Y., Zhou L., 2019, Genomic and biological characterization of the *Vibrio alginolyticus*-infecting “*Podoviridae*” bacteriophage, vB_ValP_IME271. *Virus Genes*. 55: pp. 218-226.
83. Amarillas L., Rubí-Rangel L., Chaidez C., González-Robles A., Lightbourn-Rojas L., León-Félix J., 2017, Isolation and characterization of phiLLS, a novel phage with potential biocontrol agent against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 8: pp. 279350.
84. Ren Y., Wang L., Chen R., Li X., Li S., Li J., Li Q., Wang Z., Xu Y., 2022, Isolation and characterization of a novel phage vB_ValP_VA-RY-3 infecting *Vibrio alginolyticus*. *Virus Research*. 322: pp. 198945.
85. Xu Y., Sun J., Hu J., Bao Z., Wang M., 2023, Characterization and Preliminary Application of a Novel Lytic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophage vB_VpaP_SJSY21. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(24): pp. 17529.
86. Tovar A., Moreno C., Manuel-Vez M.P., García-Vargas M., 2000, Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters. *Water Research*. 34(1): pp. 334-342.

PHỤ LỤC

Trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn H3.

GCTACCTTGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGGCGGAC
 GGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCAT
 GATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTA
 GTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA
 ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
 GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGT
 AGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTAAAGTCA
 GATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGG
 GTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCT
 GGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
 CGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGCTTAAGTAGACC
 GCCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT
 GTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCAGAGATGGA
 TTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTACCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGT
 TAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTCCGGAACTCCAGGGAGACT
 GCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACA
 CGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCCAACCTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCCAAAAGTGCCTCGTA
 GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCAC
 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTAGG
 TAGTTTTAACCTTCGGGGGACGTACCCTGG

Trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn A2.

GCCTACCATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGGCGGA
 CGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCA
 TGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCT
 AGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG
 AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA
 TGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGT
 TAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTAAAGTC
 AGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGG
 GGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCT
 TGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGCTTAAGTAGAC
 CGCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
 TGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCAGAGATGG
 ATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTACGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGG
 TTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCACCGAGTAATGTCCGGAACTCCAGGGAAAC
 TGCCGGTGAATAACCGGAGGAAGGTGGGGACAACTTCAAGTCATCATGGCCCTTACAAAATAGGGCTACAC
 ACGTGCTACAATGGCCCATAACAGAGGGCGGCCAACTTGCAAATGTGAACCAATCCCCAAAAGGCGCGCTCT
 ATTCCGGATTGGAGTCCCACCCCTCTCCATGAAAACGGAACCCTTAGTAATTTGGGAATAGAATGCC
 CCGGGAAACGTTCCCGGCTTTTAACCCCCCCCCCCCCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTAG
 GTAGTTTTAACCTTCGGGGGACGTACCATTGA

Trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn D1.

CGCCTACCATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGC
 ATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGC
 TAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG
 GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
 ATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGT
 GTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTAAAGT
 CAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGG
 GGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
 CTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGA
 CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
 ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGA ACTTTCCAGAGATG
 GATTGGTGCCTTCGGGA ACTCTGAAACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGG
 GTTAAGTCCC GCAACCAACCGCAACCCCTTATCCTTGTTTGCCACCGAGTAATGTCCGGGA ACTCCAGGGGAG
 ACTGCCGGGATAAAACCGGAGGAAGGTGGGGACA ACTTCAAGTCATCATGGCCCTTACAAGTAGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGCCCATACAGAGGGCGGCCA ACTTGCGAAAGGGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTC
 GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGC
 CACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGT
 AGGTAGTTTAACCTTCGGGGGACGCTACC ACTTGTTC

Trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn A1.2.

GGCTACACATGCAGTCGAGCGGCAGCGACATAAACAATCCTTCGGGTGCGTCTATGGGCGGGCAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
 CATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAG
 CTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT
 GGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
 GATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTTTC
 ATGCGTTAATAGCGTATGGATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTAGTTAAG
 TCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCTGACTAGAGTACTGTAGAGG
 GGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
 CCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 CGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAG
 ACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCATAGA ACTTAGCAGAGAT
 GCTTTGGTGCCTTCGGGA ACTATGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
 GGTTAAGTCCC GCAACAAGCGCACCCCTTATCCTTGTTTGCCACCGAGTAATGTCCGGGA ACTCCAGGGGAG
 ACTGCCGGTGATAAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACTTCAAGTCATCTTGGCCCTTACGGATAGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGGGCGGCCA ACTTGCAAAAAGTGAAGCGAATCACA AAAAATTACCTC
 CTAGTCCGGATGGGGTTTCGCAACCCCCCCCCCAGAATGGGAAACCTAGTAATGGGAAATCAGAAAAC
 CCCGAAAATTTCCCGCTTTAACCCCCCCCCCCCCGGGAGGGGCGCCAAAAGGGGGTTTTTCTCCAGGT
 CCCCCTTTTAATTTTGGGGGGTGATTAAGACATAAGAATTGAGGGG

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TẠP CHÍ KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ
ISSN 1859 - 2171, 2734 - 9098

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Số: 31../2024

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CHỨNG NHẬN

Bài báo khoa học có tiêu đề “*Isolation and characterization of a lytic bacteriophage C1 specific to Vibrio parahaemolyticus in Quang Ninh province*” của các tác giả Ngô Thị Huyền Trang (Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), Nguyễn Thị Thanh Ngọc (Trường Đại học Công nghệ Đông Á), Nguyễn Thị Thu An, Nguyễn Văn Thế, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Phí Quyết Tiến (Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam), Lương Hùng Tiến (Trường Đại học Nông Lâm – Đại học Thái Nguyên), Quách Ngọc Tùng (Viện Công nghệ Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã được Hội đồng biên tập Tạp chí Khoa học và Công nghệ tổ chức phản biện khoa học và sẽ được đăng tải trong kế hoạch xuất bản năm 2024 (Chuyên san *Khoa học Nông nghiệp – Lâm nghiệp – Y Dược*).

Thái Nguyên, ngày 24 tháng 4 năm 2024

TỔNG BIÊN TẬP



PGS.TS Nguyễn Hữu Công

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A LYTIC BACTERIOPHAGE C1 SPECIFIC TO *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN QUANG NINH PROVINCE

Ngô Thị Huyền Trang^{1†}, Quách Ngọc Tung^{1†}, Nguyễn Thị Thu An¹, Nguyễn Thị Thanh Ngọc², Vũ Thị Hạnh Nguyễn¹, Phi Quyet Tien^{1*}

¹Institute of Biotechnology – VAST, ²Faculty of Food Technology, East Asia University of Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received:	Acute hepatopancreatic necrosis disease caused by <i>Vibrio parahaemolyticus</i> is the main cause leading to economic losses to shrimp farming. In addition, the emergence of multiple drug-resistant <i>Vibrio</i> has underscored the urgent need for alternative strategies such as phage therapy. In the present study, 7 bacteriophages specific to <i>Vibrio</i> spp. were isolated from water and sludge samples collected at the shrimp farms in Quang Ninh province. Among them, phage C1 was highly effective in lysing <i>Vibrio parurili</i> A1.2, <i>Vibrio alginolyticus</i> A2, <i>V. alginolyticus</i> D1, and especially <i>V. parahaemolyticus</i> H3. Using transmission electron microscopy, the phage C1 was observed to belong to the Podoviridae family with a head diameter of 52.73 nm and a very short tail. Phage C1 exhibited the highest titer ($9.6 \pm 0.12 \log$ PFU/mL) at an optimal MOI ratio of 0.0001. Assessment of lysis potential revealed that phage C1 was able to maintain strong lytic activity for 10 hours. Notably, C1 had a brief latent phase (<10 min) with a high burst size of 294 PFU/mL and resilience to a decent range of temperatures (20-50°C) and pHs (5-11). These findings further enhance our understanding of biological characteristics <i>Vibrio</i> phage from local shrimp farms and its potential as a biocontrol agent for vibriosis included by <i>Vibrio</i> spp.
Revised:	
Published:	
KEYWORDS	
Bacteriophage	
Lytic activity	
Phage therapy	
Vibriosis	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	

†,

PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA THỰC KHUẨN THỂ CÓ KHẢ NĂNG LY GIẢI *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* TẠI TỈNH QUẢNG NINH

Ngô Thị Huyền Trang, Quách Ngọc Tung, Nguyễn Thị Thu An, Vũ Thị Hạnh Nguyễn, Phi Quyet Tien*

¹Viện Công nghệ sinh học, VAST, ²Khoa Công nghệ thực phẩm, Đại học Công nghệ Đông Á

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài:	Bệnh hoại tử gan tụy cấp do <i>Vibrio parahaemolyticus</i> là nguyên nhân chính gây thiệt hại kinh tế tới ngành nuôi tôm. Hơn nữa, sự xuất hiện của <i>Vibrio</i> đa kháng thuốc đã nhấn mạnh tầm quan trọng của liệu pháp thực khuẩn thể như phương pháp thay thế nhằm kiểm soát dịch bệnh. Trong nghiên cứu này, 7 thực khuẩn thể đặc hiệu với <i>Vibrio</i> spp. được phân lập từ các mẫu nước và bùn thu tại các trại nuôi tôm ở tỉnh Quảng Ninh. Trong đó, thực khuẩn thể C1 có khả năng ly giải <i>Vibrio parurili</i> A1.2, <i>Vibrio alginolyticus</i> A2, <i>V. alginolyticus</i> D1 và đặc biệt là <i>V. parahaemolyticus</i> H3. Sử dụng kính hiển vi điện tử quét, thực khuẩn thể C1 có đặc điểm giống với họ Podoviridae dựa vào đường kính đầu 52,73 nm và đuôi rất ngắn. Phage C1 thể hiện hiệu giá cao nhất ($9,6 \pm 0,12 \log$ PFU/mL) ở tỷ lệ MOI tối ưu là 0,0001. Thực khuẩn thể C1 có thể duy trì hoạt động ly giải mạnh trong 10 giờ. Đáng chú ý, C1 có pha tiềm ẩn ngắn (<10 phút) với hệ số nhân vi rút là 294 PFU/mL, bền với dải nhiệt độ (20-50°C) và dải pH (5-11). Những kết quả trên nâng cao sự hiểu biết của chúng ta về đặc tính sinh học của thực khuẩn thể
Ngày hoàn thiện:	
Ngày đăng:	
TỪ KHÓA	
Liệu pháp thực khuẩn thể	
Ly giải	
Thực khuẩn thể	
Vibriosis	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	

bản địa phân lập từ các trang trại nuôi tôm và minh chứng tiềm năng kiểm soát sinh học của thực khuẩn thể đối với bệnh vibriosis.

1. Introduction

Vibriosis, caused by *Vibrio* pathogens, stands as one of the most prevalent infections posing a serious threat to shrimp worldwide. *Vibrio* species are able to play significant roles in biogeochemical cycles of aquatic ecosystems due to their high abundance and versatility [1]. However, some *Vibrio* spp. such as *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, and *V. vulnificus* have been reported to be pathogenic to shrimp [2]. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) caused by *V. parahaemolyticus* is the most severe disease devastating the global shrimp industry. Additionally, the consumption of shrimp and its related products contaminated with *Vibrio* spp. has been reported to cause serious food poisoning [3]. The emergence of antibiotics, as a quick and effective therapeutic strategy to control the spread of bacteria, has coincided with excessive use, leading to the dispersal of multiple resistant strains and the presence of antibiotic residues in the environment and especially in shrimp [4]. Hence, exploration of alternative strategies to control *Vibrio* contamination in shrimp farming is imperative in order to improve production, reduce antibiotic use, and ensure food safety.

Bacteriophages, composed of DNA or RNA enclosed in a protein coat, are prokaryotic viruses that infect and lyse host bacteria [3]. Virulent or lytic phages attach to host bacteria through specific receptors on the cell surface. Subsequently, the viral genetic materials are injected into the host, initiating cycles of replication until the phage-derived proteins are activated to lyse and kill bacterial cells [5]. Transmission electron microscopy (TEM) is still an effective method for identification of phage. Various studies have proved that the use of phage could prevent vibriosis. Previous report showed over 70% reduction in *V. parahaemolyticus* counts within one hour of phage application [6]. The efficacy of phages as biocontrol agents was also evident by a 40% reduction in shrimp mortality upon treatment with bacteriophage against *V. alginolyticus* [7].

In Vietnam, research investigating phages as biocontrol alternatives to antibiotics in shrimp farming has only gained momentum in recent years [8]. However, a common limitation of these studies is the lack of sufficient evidence and characterization of potential *Vibrio* phage, which may hinder the practical application of phage therapy in aquaculture. It is crucial to thoroughly evaluate their morphological characteristics and lytic specificity to host strain prior to utilizing phages for broad applications. The aim of the study is to isolate and characterize a *V. parahaemolyticus* phage isolated from shrimp farms collected in Quang Ninh province. These findings will offer valuable insights for future application of phages in managing *Virbio* infections in shrimp.

2. Methods

2.1. Bacteriophage isolation

Four bacterial strains *V. panurili* A1.2, *V. alginolyticus* A2, *V. alginolyticus* D1, and *V. parahaemolyticus* H3 kindly provided by the VAST-Culture Collection of Microorganisms, Vietnam Academy of Science and Technology were used hosts for the isolation of bacteriophages. All bacterial strains were cultivated in Alkaline Saline Peptone Water (ASPW) medium (Peptone 10 g/L; NaCl 15 g/L; pH 6.2 – 7.0).

Bacteriophages were isolated from 18 water and 12 sludge samples collected in Quang Ninh province using the double agar layer method as described previously [9]. In brief, samples were centrifuged at 8000 rpm for 10 min to obtain supernatant which was then mixed with a respective volume of 2X ASPW medium. After 8-hour incubation with shaking at 37°C, the mixture was centrifuged at 8000 rpm for 5 min and then incubated with *Vibrio* cultures under shaking condition overnight. Afterwards, the mixture underwent centrifugation at 10000 rpm for 10 min at 4°C. The resulted lysis samples were later filtered through sterile 0.22 µm membrane filters and stored at

4°C. Lysis samples were then diluted with SM buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0.01% gelatin, pH 7.0). The mixture was added to the exponential phase culture of *Vibrio* in 0.3% agar ASPW and then poured over pre-solidified 1.5% agar ASPW plates. The plates were incubated overnight for plaque formation [9]. Single plaques were picked from the plate using a sterile pipette tip and the procedure was repeated at least four times for phage purification. Purified phage were stored in SM buffer at 4°C.

2.2. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Bacteriophage sample was deposited on a copper grid for absorption in dark for 30 min according to the previous protocol with the slight modification [10]. The sample was negatively stained using 1% phosphotungstic acid for 20 min and then dried for 30 min. The obtained phage samples were examined in a JEM-2100 transmission electron microscope (TEM) (JEOL, Tokyo, Japan).

2.3. Determination of lytic activity against *V. parahaemolyticus* H3

Multiplicity of Infection (MOI) is the ratio of phage particles to potential *Vibrio* host cells, which was determined according to the method previously described [10]. Briefly, *V. parahaemolyticus* H3 at log phase (~10⁸ CFU/mL) were mixed with phage suspension (~10⁸ PFU/mL) to achieve an MOI of 0,001; 0,01; 0;1; 1; 10; 100. Non-infected *Vibrio* cells were used as controls. All samples were incubated at 37°C for 10 hours with shaking at 150 rpm and lysate samples were then centrifuged at 8000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatants were filtered through a 0.22-µm membrane filter and phage titer and then assessed using the double layer agar method. The MOI with highest phage titer was considered the optimal MOI. The experiment was done in triplicate.

2.4. One-step growth curve

One-step growth curve of phage was determined as previously described with the slight modifications [11]. Phage suspension was mixed with 500 µL of *V. parahaemolyticus* H3 culture (~10⁸ CFU/mL) at optimal MOI and incubated at 37°C for 15 min for phage absorption. The mixture was then centrifuged at 10,000 rpm for 30 s at room temperature to remove free phage particles. The pellet was resuspended in 10 mL ASPW. A 100 µL sample was taken every 20 min for 1.5 hours to determine phage titer by plaques counting. The experiment was performed in triplicate. Phage burst size was calculated based on the growth curve using the formula:

$$\text{Burst size} = \frac{\text{Phage average at plateau phase}}{\text{Number of infecting phage}}$$

In which, the number of infecting phage is the initial total phages minus free phage.

2.5. Effects of temperature and pH on bacteriophage stability

Thermal and pH stability of phages was assessed according to method previously described [10]. For thermal stability, phage suspension of 10⁸ PFU/mL was incubated on ASPW for 1 hour at different temperatures (20°C, 35°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C). For pH stability, ASPW medium was prepared at pH 3-11. A volume of 1 mL phage suspension was mixed with 9 mL of ASPW at respective pH to achieve 10⁸ PFU/mL phage and then incubated at 35°C for 1 hour. The titer of phages was determined using the double layer agar method.

3. Results and Discussion

3.1. Screening of *Vibrio* lytic bacteriophage

Bacteriophages specific to 4 *Vibrio* host strains were isolated from water and sludge samples collected in Quang Ninh province. Transparent zones on the host bacterial lawn agar, called phage

plaques, indicate the presence of *Vibrio* lytic phages. Purification of phages was carried out after repeated sub-cultured until separated plaques appeared uniform in shape and size. A total of 7 presumptive phages were obtained from pure subcultures using three successive single-plaque isolations (Table 1). Three phages B1, B3 and B4 displayed infectivity towards single bacterial strain such as *V. alginolyticus* D1 or *V. parahaemolyticus* H3. In contrast, phage C1 had the most potent lytic activity against all bacterial strains, followed by phage C2. Since phage C1 displayed significant lytic activities against all tested *Vibrio* strains with visible transparent zones, C1 was selected for further characterization.

Table 1. Screening for lytic bacteriophage on different *Vibrio* strains

Host Phage	<i>Vibrio</i> <i>panurili</i> A1.2	<i>V. alginolyticus</i> A2	<i>V. alginolyticus</i> D1	<i>V. parahaemolyticus</i> H3
C1	++	++	++	++
C2	+	+	+	+
B1	-	-	+	-
B2	-	-	+	+
B3	-	-	-	+
B4	-	-	-	+
Q4	-	-	+	+

Note: ++, clear plaques; +, plaques with heavy turbidity; -, no plaques formed.

It is worthy to note that *V. parahaemolyticus* H3 strain was the most sensitive host (Table 1). Despite being the same species, *V. alginolyticus* A2 was quite resistant to isolated phages as compared to *V. alginolyticus* D1. *V. parahaemolyticus* were often reported to be related to infections, especially AHPND, in shrimps [8]. Similar to the present study, six phages from sediments and seafoods in Korea were capable of lysis multiple *V. parahaemolyticus* hosts, of which the most efficient phage Vpp2 had lytic property on 3 different *Vibrio* species [12]. In addition, a bacteriophage VVP1 from shrimp grow-out pond was able to infect both *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* [13]. A broad host-specific bacteriophage seemed an attractive feature, especially when applying it in preventing *Vibrio* spp. from shrimp farms.

3.2. Morphological analysis of bacteriophage C1

Plaques of C1 phage exhibited high transparency and round shape, with diameters of approximately 1-3 mm after 10 h incubation (Figure 2A). Halo around the plaques were also observed for C1 phage, suggesting depolymerization enzymes activity on bacterial cell envelopes that potentially contribute to phage-derived enzymes approach for phage therapy. This result was similar to that of lytic phage R16F against *V. parahaemolyticus* 1.1997^T, with clear plaques of about 2-3 mm in diameter [14].

TEM revealed that C1 consisted of a head diameter of approximately 52.73 nm resembling a isometric shape, and a very short tail (Figure 2B). In agreement with our findings, a *Podoviridae* phage vB_VpaP_DE10 also possessed an icosahedral shape with diameter of 52.4 ± 2.5 nm [15]. These indicated that C1 could be a putative member of the *Podoviridae* family under *Caudovirales* order according to classification guidelines by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2020 [16]. Of note, a large number of studies identified *Vibrio* lytic phages belonged to *Siphoviridae* family [4, 8]. In Vietnam, only *V. parahaemolyticus* lytic phage isolated from Can Tho province was reported to belong to *Demereviridae* [8]. Hence, the current study was the first identification of *Podoviridae* phage from shrimp farm in Vietnam.

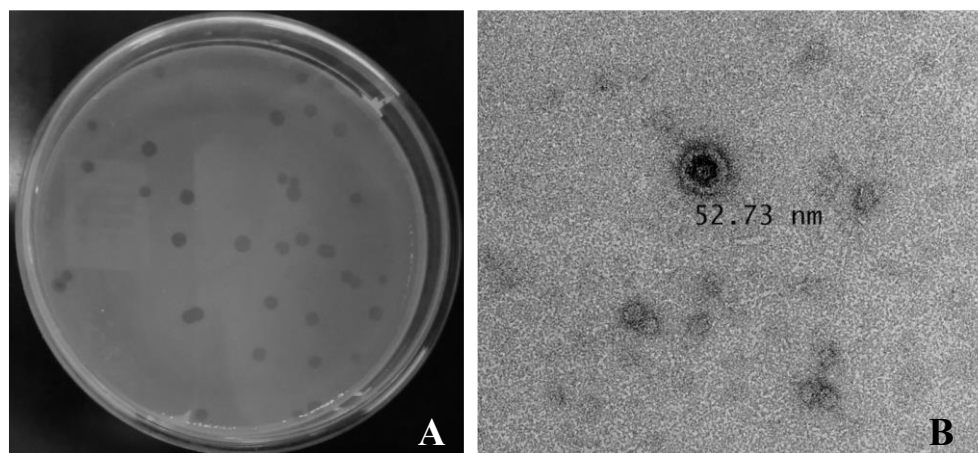


Figure 2. Plaque morphology (A) and transmission electron photographs of bacteriophage C1 (B).

3.3. Determination of optimal multiple of infection

Given that optimal MOI is the value at which a maximal phage yield is achieved [9], optimal MOI of phage C1 was determined using *V. parahaemolyticus* H3 as the host (Figure 3A). At MOI of 0.0001, the highest bacteriophage titer at 9.6 ± 0.12 log PFU/mL was observed after 10-hour incubation at 37°C, indicating that 0.0001 was the optimal MOI. In agreement with our results, Yu *et al.* reported the optimal MOI for *V. owensii* phages P7A and P8D was 0.0001. Meanwhile, the optimal MOI of three *Podoviridae* phages Vp22, Vp02 and Vp33 were 0.001, 0.1 and 1, achieving phage titer at 9.52, 10.02 and 8.34 log PFU/mL, respectively [10]. This discrepancy indicates varying MOI could be observed for different phages. Moreover, a lower MOI of C1 implied that fewer phages are required to infect the same number of bacteria, rendering it a favorable option to minimize application costs in phage therapy development.

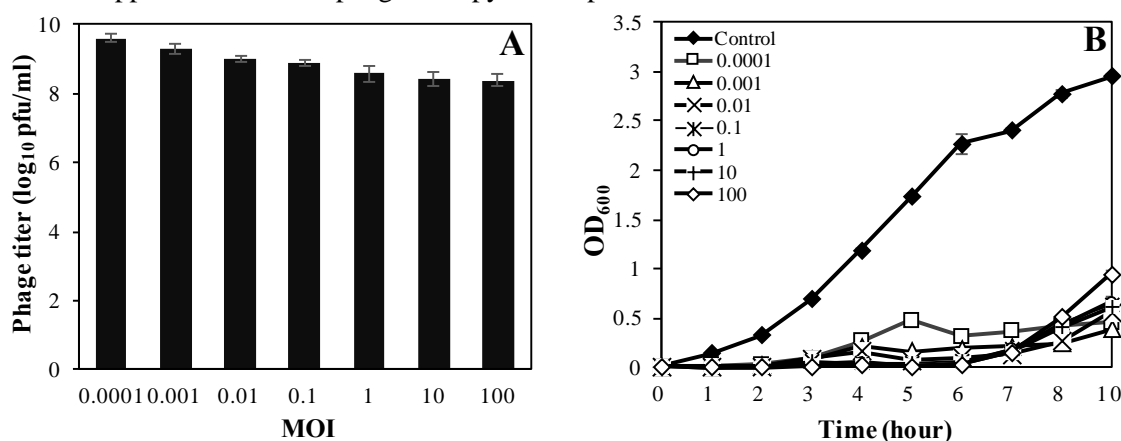


Figure 3. Determination of optimal MOI (A) and lytic activity of C1 against *V. parahaemolyticus* H3 at different MOI for 10 h.

In vitro lysis activity of phage C1 against *V. parahaemolyticus* H3 was evaluated using seven MOI ratios (Figure 3B). For the control, the OD₆₀₀ value *V. parahaemolyticus* H3 kept increasing and reached approximately OD₆₀₀ of 3.0 after 10 h. Meanwhile, all phage-treated samples exhibited a significant reduction of OD₆₀₀ during 10 h. This result indicates a highly effective lytic activity

of phage C1 on the host *V. parahaemolyticus* H3 regardless of the MOI ratios. The vibriophage vB-VpP_MGD2 of the *Podoviridae* family, demonstrated a complete inhibition of *V. parahaemolyticus* strains only at a high MOI of 100, while lower MOIs only sustained the effect for about 4 hours [17]. Although there was a slight increase in OD₆₀₀ for all C1 treated samples at around 7 hours, bacterial growth remained suppressed throughout the 10-hour infection. This rebounding effect could imply the emergence of phage-resistant progeny possibly due to unexplored mutations in the host bacteria or selective pressure on phage infectivity. Bacterial resistance is often eliminated by using phage cocktails.

3.4. Bacteriophage one-step growth curve

One-step growth curve was constructed to further characterize the life cycle of bacteriophage C1 on host *V. parahaemolyticus* H3. As depicted in Figure 4, the life cycle of phage C1 includes a short latent phase of less than 10 min, a burst phase lasting about 40 min with a burst size of 294 PFU per infected cell, followed by a plateau phase (Figure 4). This demonstrated phage C1 ability to produce a large number of progeny in a short time while effectively infecting the host. In agreement with our findings, *Podoviridae* phages, including vB_VpaP_DE10, vB_VpP_DE17, and vB_VpP_MGD2, were reported with short latent phase from 5-25 min and burst period from 25-40 min [15, 18]. C1 had a stronger lysis capacity at 294 PFU/infected cells, as compared to vB_VpaP_DE10 (244 PFU/infected cells). In addition, GHSM17 phage was considered to have excellent lytic effect on *V. parahaemolyticus* with a longer latency period (20 min) and rise phase (100 min) and higher burst size of 316 PFU/cells [17]. Taken together, phage C1 possess attractive characteristics to be a phage therapy candidate.

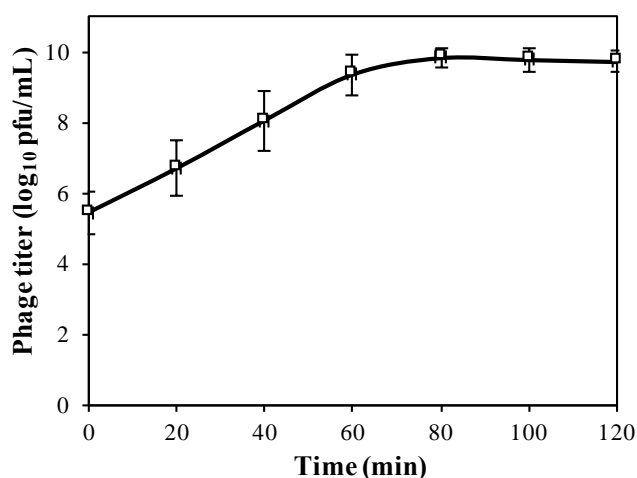


Figure 4. One-step growth curve of bacteriophage C1 on host *V. parahaemolyticus* H3

3.5. Temperature and pH stability of bacteriophage

The ability to withstand environmental physical and chemical factors, such as temperature and acidity, is critical in determining an effective candidate for industrial applications [12]. Phage C1 could survive temperature below 60°C and remained stable from 20- 50°C with titers of around 8 log PFU/mL (Figure 5A). However, after being exposed to 70°C, C1 titer decreased noticeably to only about 5 log PFU/mL which was then completely diminished at 80°C. Sensitivity to different pH levels is illustrated in Figure 5B with high activity of C1 sustained from pH 5-11 (~ 8.0 log PFU/mL). Meanwhile, C1 phage titer was significantly affected at pH 4.0 ($7.1 \pm 0,106$ log

PFU/mL) and no infectivity was observed at pH 3.0. Likewise, increasing pH level to 12 witnessed complete inactivation of C1.

In previous study, vB_VpP_DE17 was assessed at a wider temperature range and displayed stability from 4-50°C as well as a consistent pH of 5-10 [18]. Some phage members of the *Siphoviridae* family, for example, two phages BA3 and CA8 were more sensitive to temperature and pH changes with optimal ranges from 20-40°C and pH 5.0-7.0 [19]. These results indicate that different phage strains tolerate different thermal and acidity conditions. The ability of C1 to resist environmental stresses indicates C1 could be an useful phage for applications against pathogenic *Vibrio* spp.

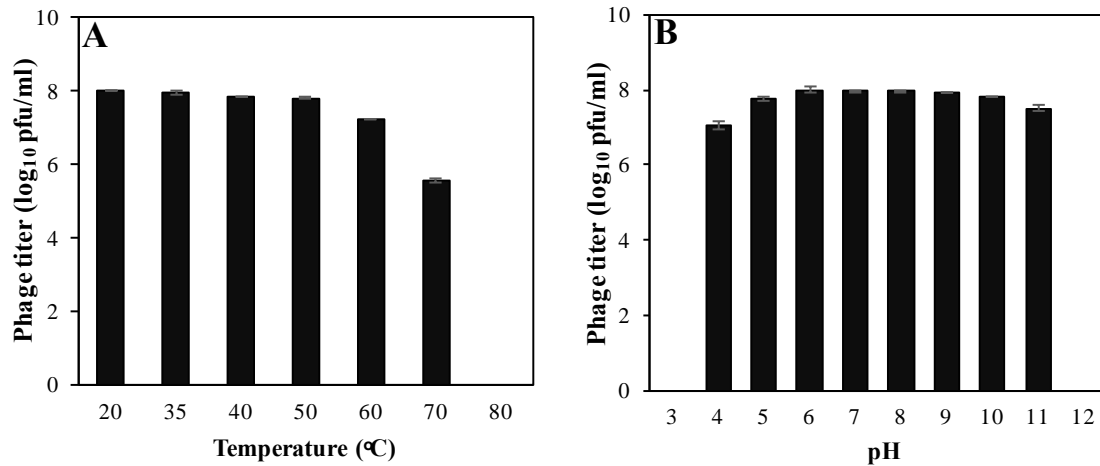


Figure 5. Effects of different temperature (A) and pH(B) on the stability of bacteriophage C1

4. Conclusion

In this study, we provided for the first time the isolation of a *Podoviridae* vibriophage C1 from shrimp farms in Quang Ninh province. Phage C1 displayed a broad host range against 4 tested *Vibrio* strains. Using *V. parahaemolyticus* H3 as a host, the optimal MOI for bacteriophage propagation was determined to be 0.0001 and lytic potential was sustained for 10 h. Importantly, C1 exhibited a short latent period, a big burst size and the ability to tolerate an adequate range of temperature and pH levels, making it a desirable candidate for phage therapy. Future exploration of the C1 phage genome, including analysis of lysogenic and virulent genes, could provide additional insights into its safety and suitability as an alternative biocontrol agent for treating shrimp diseases caused by *Vibrio*.

Acknowledgements

Ngoc Tung Quach was funded by the Postdoctoral Scholarship Programme of Vingroup Innovation Foundation (VINIF), code VINIF.2023.STS.78.

REFERENCES

1. **Manchanayake T, Salleh A, Amal MNA, Yasin ISM, Zamri-Saad M.** Pathology and pathogenesis of *Vibrio* infection in fish: A review. *Aquaculture Reports* 2023;28:101459.
2. **Ina-Salwany MY, Al-Saari N, Mohamad A, Mursidi FA, Mohd-Aris A et al.** Vibriosis in fish: A review on disease development and prevention. *Journal of aquatic animal health* 2019;31(1):3-22.

3. **Brossard Stoos KA, Ren J, Shields-Cutler RR, Sams KL, Caldwell S et al.** Coastal water bacteriophages infect various sets of *Vibrio parahaemolyticus* sequence types. *Frontiers in Microbiology*, Original Research 2022;13.
4. **Yu YP, Gong T, Jost G, Liu WH, Ye DZ et al.** Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. *FEMS microbiology letters* 2013;348(2):112-119.
5. **Gordillo Altamirano FL, Barr JJ.** Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical microbiology reviews* 2019;32(2).
6. **Dubey S, Singh A, Kumar BTN, Singh NK, Tyagi A.** Isolation and characterization of bacteriophages from inland saline aquaculture environments to control *Vibrio parahaemolyticus* contamination in shrimp. *Indian journal of microbiology* 2021;61(2):212-217.
7. **Hao Q, Bai Y, Zhou H, Bao X, Wang H et al.** Isolation and characterization of bacteriophage VA5 against *Vibrio alginolyticus*. *Microorganisms* 2023;11(12):2822.
8. **Van T, Do Tan K, Dung L, Ngoc L, Thi N et al.** Effect of bacteriophages and chamber bitter (*Phyllanthus amarus*) in combination on *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 2023.
9. **Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP.** Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2009;501:69-76.
10. **Tan CW, Rukayadi Y, Hasan H, Abdul-Mutalib N-A, Jambari NN et al.** Isolation and characterization of six *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophages from seafood samples. *Frontiers in Microbiology*, Original Research 2021;12.
11. **Fu J, Li Y, Zhao L, Wu C, He Z.** Characterization of vB_ValM_PVA8, a broad-host-range bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, Original Research 2023;14.
12. **Chang H-J, Hong J, Lee N, Chun HS, Kim HY et al.** Growth inhibitory effect of bacteriophages isolated from western and southern coastal areas of Korea against *Vibrio parahaemolyticus* in Manila clams. *Applied Biological Chemistry* 2016;59(3):359-365.
13. **Stalin N, Srinivasan P.** Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Veterinary microbiology* 2017;207:83-96.
14. **Chen Y, Li W, Shi K, Fang Z, Yang Y et al.** Isolation and characterization of a novel phage belonging to a new genus against *Vibrio parahaemolyticus*. *Virology journal* 2023;20(1):81.
15. **Ye Y, Chen H, Huang Q, Huang S, He J et al.** Characterization and genomic analysis of novel *Vibrio parahaemolyticus* phage vB_VpaP_DE10. *Viruses* 2022;14(8).
16. **Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM et al.** Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). *Archives of virology* 2020;165(11):2737-2748.
17. **Liang X, Wang Y, Hong B, Li Y, Ma Y et al.** Isolation and characterization of a lytic *Vibrio parahaemolyticus* phage vB_VpaP_GHSM17 from sewage samples. *Viruses* 2022;14(8).

-
18. **Yang M, Chen H, Guo S, Tan S, Xie Z et al.** Characterization and genome analysis of a novel *Vibrio parahaemolyticus* phage vB_VpP_DE17. *Virus Research* 2022;307:198580.
 19. **Yang M, Liang Y, Huang S, Zhang J, Wang J et al.** Isolation and characterization of the novel phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for lysing *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol* 2020;11:259.

Số: 321/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 08 tháng 04 năm 2024

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/08/2021 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 896/QĐ-HVKHCN ngày 25/05/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 1 năm 2022;

Căn cứ Quyết định số 1095/QĐ-HVKHCN ngày 02/10/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;
Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Ngô Thị Huyền Trang với đề tài: “Nghiên cứu phân lập và đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của thực khuẩn thể thu thập tại tỉnh Quảng Ninh”.

Ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.14.



GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 321/QĐ-HVKHCN ngày 08/04/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Ngô Thị Huyền Trang

Tên đề tài: Nghiên cứu phân lập và đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của thực khuẩn thể thu thập tại tỉnh Quảng Ninh.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: TS. Quách Ngọc Tùng

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong đoàn
1.	GS.TS. Chu Hoàng Hà	Công nghệ sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	PGS.TS. Đoàn Văn Thược	Công nghệ sinh học	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Phản biện
3.	PGS.TS. Nguyễn Quang Huy	Hóa sinh học	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Phản biện
4.	TS. Hoàng Thị Thu Hằng	Di truyền - Truyền nhiễm	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên Thư ký
5.	PGS.TS. Đỗ Thị Huyền	Hóa sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./. *gc*

KHOA HỌC VIỆN

BI

T

đốc Học

văn thạc

T

Vibrio s

N

N

H

Học vi

viên:

đã có
giá lu

1. Đa

2. Ch

3. Th

4. H

5. Ph

...v

...t

...t

...B

...m

TK

Hà Nội, ngày 18 tháng 05 năm 2024

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 321/QĐ-HVKHCN ngày 08/04/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Ngô Thị Huyền Trang

Tên đề tài: Nghiên cứu phân lập và đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của thực khuẩn thể thu thập tại tỉnh Quảng Ninh

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 18/05/2024 Hội đồng đã họp tại phòng họp 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 14 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

1 GS.TS. Chu Hoàng Hà

Chủ tịch hội đồng

2. TS. Hoàng Thị Thu Hằng

Thư ký hội đồng

3. PGS.TS. Đoàn Văn Thược

Phản biện 1

4. PGS. TS. Nguyễn Quang Huy

Phản biện 2

5. PGS.TS. Đỗ Thị Huyền

Ủy viên hội đồng

Thành viên vắng mặt: (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng

5. Phản biện 1: Luận văn thu được các kết quả phong phú, phù hợp với tên luận văn. Căn chỉnh sửa một số câu, thuật ngữ, từ 4, 7, 10, 12, 3 phần tổng quan; chỉnh sửa nhiệt độ, trình tự mô tả; cho biết rõ chu trình nhiệt của p.i nhân gene; bổ sung k quả nghiên cứu hình 3, 11, 3, 13, gty: OP, bám đầu; mô tả ph. x. hình thái vi khuẩn; xem xét k luận tên loài 2 hình thái TKT; chỉnh sửa kết luận.



6. Phản biện 2: Đề tài có tính cấp thiết, thực hiện được nhiều nghiên cứu có ý nghĩa... Phương pháp tư duy... Kết luận nêu trên... 3. kết luận... Căn cứ... của... các hình ảnh... chuyên... dạng biểu đồ... cột; Cập nhật TLTK mới; cách b... số liệu để làm rõ các giá trị của... thu được... KL: đạt

7. Học viên trả lời:

Học viên xin tiếp thu ý kiến đóng góp của phản biện và chỉnh sửa luận văn.

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

Luận văn thực hiện xong, thành công, thể hiện được năng lực nghiên cứu khoa học của học viên. Căn cứ... của... chi tiết các thành phần môi trường; thống nhất lại... người về TKT. Vai trò của bước đưa dịch nổi lên... như PGS.TS. Đỗ Thị Huyền

Cần cải thiện chất lượng hình ảnh, chỉnh sửa lỗi chính tả 22, 32, 33, 34, 37

9. Học viên trả lời

Bước đưa dịch nổi vào để tăng sinh số lượng thực thể

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: PGS.TS. Đoàn Văn Thiệu

Ủy viên: PGS.TS. Đỗ Thị Huyền

Ủy viên: TS. Hoàng Thị Thu Hằng

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 05

Số phiếu thu về: 05

Tổng số điểm: 43,2

Điểm trung bình: 8,64

Điểm thưởng công trình công bố: 0.8

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 9.44

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn Đạt (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:

..... Không trùng lặp

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

— Luận văn đạt yêu cầu luận văn Thạc sĩ;

— Đề nghị học viên chỉnh sửa luận văn theo góp ý; các lưu

Buổi họp đã kết thúc vào 1.6 giờ 45 phút, ngày 18/5/2024

Hà Nội, ngày 18 tháng 5 năm 2024

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Hoàng Thị Thu Hằng

Chun Hong Ha

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

GIÁM ĐỐC



Vũ Đình Lâm

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Đoàn Văn Thuộc Học hàm, học vị: PGS.TS

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện

Cơ quan công tác: Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Họ và tên học viên: Ngô Thị Huyền Trang

Tên đề tài: Nghiên cứu phân lập và đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của thực khuẩn thể thu thập tại Quảng Ninh

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số 8420114

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Việt Nam là nước nông nghiệp đang phát triển và có điều kiện khí hậu, địa lí phù hợp với ngành nuôi trồng và chế biến thủy sản. Tuy nhiên, ngành nuôi trồng thủy sản đang phải đối diện với nhiều loại dịch bệnh. Do vậy, nghiên cứu tìm ra các biện pháp phòng chống dịch bệnh phù hợp sẽ góp phần phát triển hơn nữa ngành nuôi trồng và chế biến thủy sản ở Việt Nam. Trong đề tài nghiên cứu này, tác giả phân lập và tuyển chọn thực khuẩn thể (phage) có khả năng kí sinh trên vi khuẩn *Vibrio* spp. nhằm định hướng sản xuất chế phẩm kiểm soát các vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh trên tôm. Đề tài nghiên cứu thể hiện ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

2. Sự trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đã có một số công trình nghiên cứu sử dụng thực khuẩn thể trong kiểm soát vi khuẩn *Vibrio* spp., tuy nhiên đối tượng và nội dung của nghiên cứu này có một số khác biệt so

với các nghiên cứu trước đó. Luận văn trích dẫn tương đối đầy đủ, rõ ràng các tài liệu tham khảo.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo

Các nội dung của đề tài luận văn phù hợp với tên đề tài, với chuyên ngành đào tạo (Sinh học thực nghiệm) và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã được sử dụng để hoàn thành luận văn

Tác giả đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu cơ bản được dùng trong chuyên ngành bao gồm các phương pháp vi sinh (phân lập, tuyển chọn, nuôi cấy vi sinh vật, giữ giống và nuôi cấy virus), sinh học phân tử (nghiên cứu tách chiết và giải trình tự gen 16S rRNA để sử dụng trong định loại). Đây là các phương pháp cơ bản thường được dùng trong nghiên cứu. Các phương pháp hiện đại, đảm bảo độ tin cậy của các kết quả nghiên cứu thu được.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn

- Tác giả đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn *Vibrio*, đã nghiên cứu đặc điểm hình thái, hóa sinh, giải đoạn trình tự gen 16S rRNA của 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn, đồng thời sử dụng chúng làm vật chủ cho các nghiên cứu tuyển chọn thực thể khuẩn tiếp theo.
- Phân lập được 16 chủng thực thể khuẩn và tuyển chọn được chủng C1 có khả năng gây bệnh trên cả 4 chủng *Vibrio* spp tuyển chọn.
- Đã xác định được một số đặc tính ly giải của thực thể khuẩn C1 như tỉ lệ lây nhiễm, thời gian tiềm tàng, số lượng trung bình thực thể khuẩn giá phóng/tế bào vi khuẩn (294 PFU/CFU), đánh giá được ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến sự tồn tại của thực thể khuẩn C1.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi

Luận văn có một số lỗi, tác giả nên xem xét chỉnh sửa, cụ thể như sau:

Phần tổng quan

- Tên Latinh của ngành, lớp, bộ, họ không viết nghiêng (trang 6).

- Trang 7, kích thước nên dùng đường kính thay cho chiều rộng, Hình 0.1, cần chú thích rõ độ phóng đại của hình, kiểm tra lại thông tin hình ảnh vi khuẩn dưới kính hiển vi thường.

- Nên lược bỏ phần lược sử nghiên cứu thực thể khuẩn (trang 9), xem lại thông tin mô tả những đặc điểm của thực thể khuẩn trang 10 – thực thể khuẩn có nhiều hình dạng chứ không phải chỉ có dạng đầu đuôi – thống nhất thông tin với trang 11.

- Nên dùng thuật ngữ Vi sinh vật cổ thay thế cho thuật ngữ vi khuẩn cổ.

- Phần mô tả chu trình sống của thực thể khuẩn, trang 12 và 13 chưa chuẩn xác, nên hiệu đính lại cho chuẩn.

- Trang 18, nên bổ sung thông tin để làm nổi bật những khác biệt của nghiên cứu này với những nghiên cứu trước đó ở Việt Nam.

Phân phương pháp

- Thống nhất nhiệt độ sử dụng trong nghiên cứu, phần phương pháp trang 20 (30°C), phần kết quả trang 25 (37°C).

- Xem lại kí hiệu trình tự môi: 27F và 1429R hay 27F và 1492R. Cho biết chu trình nhiệt trong phản ứng PCR nhân đoạn trình tự gen 16S rRNA.

- Trang 21 cần viết rõ môi trường ASPW lỏng hay đặc.

- Bổ sung phương pháp nghiên cứu để có kết quả như trình bày trong hình 3.11 và 3.13. Cho biết với mật độ vi khuẩn là 10^8 CFU/mL thì giá trị OD là khoảng bao nhiêu?

- Bổ sung phần phương pháp nghiên cứu cho các kết quả nghiên cứu về mặt hình thái, đặc điểm hóa sinh của 4 chủng vi khuẩn tuyển chọn. Mô tả phương pháp xác định Gram, oxidase và catalase.

Phân kết quả và thảo luận

- Hình 3.5 trang 29 không nhìn thấy các băng DNA của marker.

- Bổ sung mã số truy cập của 4 chủng tuyển chọn vào hình 3.6 trang 30.

- Chỉ dựa vào sự tương đồng 99% của đoạn trình tự gen 16S rRNA để kết luận tên loài của các chủng vi khuẩn phân lập được thì hơi vội – nên xem lại cách diễn đạt.

- Trang 36 – chỉ dựa vào hình thái để phân loại chủng C1 thì không thuyết phục, đề nghị lược bỏ phần này.

Phần kết luận

- Điều chỉnh lại kết luận 1 phù hợp với phần sửa của kết quả.
- Bỏ kết luận 3 vì không đủ căn cứ.
- Kết luận 4 nên trình bày rõ ràng hơn.

Phần tài liệu tham khảo

- Chính sửa lại theo một mẫu thống nhất.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên các tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nội dung nghiên cứu và các kết quả cơ bản của luận văn đã được công bố trên tạp chí Khoa học và Công nghệ của Đại học Thái Nguyên.

8. Kết luận chung

Hình thức và nội dung của luận văn đáp ứng yêu cầu của một luận văn thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm theo quy chế đào tạo thạc sĩ của Bộ Giáo dục và Đào tạo.

Luận văn có đủ điều kiện để bảo vệ trước Hội đồng để tác giả nhận học vị Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày 14 tháng 5 năm 2024

Xác nhận của đơn vị công tác

Người viết nhận xét
(Ký và ghi rõ họ tên)

PGS.TS. Đoàn Văn Thược

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Quang Huy PGS.TS... Học hàm, học vị: PGS.TS

Chức danh trong Hội đồng: ... Phó Giám đốc ...

Cơ quan công tác: ... Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG HN

Họ và tên học viên: ... Ngô Thị Huyền Trang ...

Tên đề tài: ... Nghiên cứu phản ứng và đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn Vibrio gây bệnh tiêu hóa của thực khuẩn thể khuẩn

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14 tại Quảng Ninh

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Bệnh do vi khuẩn Vibrio là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh ở tôm gây ra nhiều thiệt hại về kinh tế và việc sản xuất không ổn định nghiêm trọng và đặc biệt là tình trạng lây nhiễm bệnh. Việc dùng chủng vi khuẩn probiotic giúp cải thiện như các chủng họ phát triển mạnh hoặc khi cần việc duy trì thực khuẩn thể khuẩn (chủng probiotic) trên

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài này có sự tương đồng với các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước. Phần tài liệu tham khảo trung thực, rõ ràng và đầy đủ các thông tin.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài phù hợp với chuyên ngành / mã số đào tạo. Nội dung nghiên cứu gắn liền với mục đích của đề tài nghiên cứu. (ii) phản ứng sinh học thực khuẩn thể có khả năng ly giải Vibrio và (iii) đánh giá khả năng ly giải thực khuẩn thể phù hợp với chuyên ngành Sinh học thực nghiệm. Mã số đào tạo phù hợp với chuyên ngành.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Các phương pháp phân tích trên có tính dân số sống trong FLTK
Được mô tả khá đủ hết và phù hợp với nội dung và kết
quả thu được.
Các mẫu thu thập tại địa điểm có địa dư rõ ràng và quản
trị rất chặt chẽ đảm bảo tính chính xác.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Đã phân lập và định danh 4 chủng vi khuẩn gây bệnh lý trên
hàng phân Vibrio alginolyticus DT, V. parahaemolyticus H.2,
V. parvus A1-2 và V. alginolyticus A2.
Đã sàng lọc được chủng vi khuẩn thể C có phổ hẹp sống
và sinh sản có 4 chủng Vibrio từ 16 chủng ICT phân lập
và sinh sản được từ C thuộc họ Podarividae, bộ Caud
Đã xác định được một số tác nhân dinh dưỡng của thực
vi khuẩn thể C.

Kết quả nghiên cứu là phong phú, đáp ứng yêu cầu của đề
tài khoa học.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Một số ảnh hưởng khác biệt rõ rệt khác biệt. Nên in màu.
- (1) Chưa kể đến các vấn đề của 4 chủng trên biểu hiện trên bề mặt
 - (2) Chưa kể các xét nghiệm kỹ thuật phân H.3.6
- Phần kết luận chỉ kể luận 3 và 4 nên sắp lại
kết quả tài liệu tham khảo và có thể lược bỏ bớt (nếu cần)

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?


Đã có bài báo gửi đăng (bài báo kỹ thuật, Anh) trên
tạp chí KTL và CN của ĐH Thái Nguyên là rất tốt.
Các số liệu bài báo được phù hợp với số liệu
trong luận văn và thao tác là rất tốt.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Luận văn Đáp ứng các yêu cầu của luận văn Thạc sĩ
Chuyên ngành Sinh học thực nghiệm và có thể đưa ra
bảo vệ trước HĐ.

Khoa Văn Nghệ, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội
Hà Nội, ngày 14 tháng 5 năm 2024

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)


Nguyễn Quý Huy

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT02438689977- 0946082099

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Ngô Thị Huyền Trang Lớp: 2022A

Tên đề tài luận văn: **Nghiên cứu phân lập và đánh giá khả năng ly giải vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm của thực khuẩn thể thu thập tại tỉnh Quảng Ninh.**

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học: TS. Quách Ngọc Tùng

Ngày bảo vệ luận văn: 14h, 18/05/2024

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	<ul style="list-style-type: none">- Phần mô tả chu trình sống của thực khuẩn thể cần hiệu đính lại.- Bổ sung thêm thông tin làm nổi bật nghiên cứu này với những nghiên cứu trước đó ở Việt Nam.	<ul style="list-style-type: none">- Đã hiệu đính lại phần mô tả chu trình sống của thực khuẩn thể.- Đã bổ sung thêm thông tin nghiên cứu trong nước trong mục 1.5 về tình hình nghiên cứu trong nước.
2	<ul style="list-style-type: none">- Thống nhất nhiệt độ sử dụng trong phân lập vi khuẩn- Kí hiệu trình tự môi và chu trình nhiệt của phản ứng PCR- Bổ sung phương pháp cho kết quả hình 3.11 và 3.13.- Bổ sung các phương pháp nghiên cứu về mặt hình thái, đặc điểm hóa sinh của vi khuẩn.	<ul style="list-style-type: none">- Đã thống nhất nhiệt độ sử dụng là 37°C.- Cập môi sử dụng trong nghiên cứu là 27F và 1492R, đã bổ sung chu trình nhiệt trong Mục 2.2.2.- Đã bổ sung phương pháp nghiên cứu mục 2.2.6.- Đã bổ sung các phương pháp nghiên cứu về mặt hình thái, đặc điểm hóa sinh của vi khuẩn trong mục 2.2.1.



3	<ul style="list-style-type: none"> - Nên thay Hình 3.5, không nhìn thấy các băng DNA của marker - Bổ sung mã số truy cập của 4 chủng tuyển chọn vào hình 3.6 - Nên diễn đạt lại kết quả Mục 3.1.2.3 phù hợp - Lược bỏ phần phân loại TKT C1 trang 36. 	<ul style="list-style-type: none"> - Đã thay bằng hình khác có băng marker rõ hơn. - Mã số truy cập của 4 chủng tuyển chọn đã được bổ sung vào hình 3.6. - Kết quả đã được diễn đạt lại ở mục 3.1.2.3. - Phân phân loại TKT C1 đã được lược bỏ
4	<ul style="list-style-type: none"> - Điều chỉnh lại kết luận 1 phù hợp với phần sửa của kết quả - Bỏ kết luận 3 và trình bày rõ ràng kết quả 4 	<ul style="list-style-type: none"> Kết luận đã được điều chỉnh phù hợp với kết quả nghiên cứu và trình bày rõ ràng kết luận 4.
5	<ul style="list-style-type: none"> Tài liệu tham khảo chỉnh sửa theo một mẫu thống nhất 	<ul style="list-style-type: none"> Tài liệu tham khảo đã được chỉnh sửa theo mẫu thống nhất

Hà Nội, ngày 22 tháng 05 năm 2024

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS. TS. Chu Hoàng Hà

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

TS. Quách Ngọc Tùng

HỌC VIÊN

Ngô Thị Huyền Trang



XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung