

BỆNH VI KHUẨN MỚI NỔI NGUY HIỂM Ở CÁ HỒI VÂN VÀ NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG LIỆU PHÁP THỰC KHUẨN THỂ TRONG PHÒNG TRỊ BỆNH

Trương Đình Hoài^{1,3}, Nguyễn Văn Tuyền^{1,3},
Nguyễn Thị Hương Giang², Kim Văn Vạn¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đã được tiến hành để phân lập và xác định tác nhân gây bệnh, tìm kiếm và thử nghiệm liệu pháp thực khuẩn thể để thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh cho cá hồi vân (rainbow trout). 36 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ cá hồi vân bị bệnh trên cơ sở chẩn đoán khẳng định bằng phản ứng sinh hóa, 16S rRNA và PCR. Thực khuẩn thể Pwr-1 lần đầu tiên đã được sàng lọc và phân lập thành công trong nghiên cứu này. Chủng thực khuẩn thể thuộc họ virus *Siphoviridae*, có đường kính đầu khoảng 65 nm và đuôi dài 170-180 nm. Thực khuẩn thể xâm nhập và nhân lên trong tế bào vi khuẩn gây bệnh trong thời gian 25 phút và giải phóng 16 thực khuẩn thể mới sau khi tiêu diệt một tế bào vi khuẩn. Chủng thực khuẩn thể tồn tại tốt ở khoảng pH rộng và nhiệt độ tương đối cao. Liệu pháp thực khuẩn thể đã được sử dụng để điều trị bệnh trong điều kiện *in vitro* cho thấy thực khuẩn thể có thể diệt 100% (36/36) chủng vi khuẩn gây bệnh, với tốc độ rất nhanh và mạnh. Kết quả nghiên cứu mở ra hướng điều trị mới thay thế kháng sinh nhằm giảm thiểu tình trạng kháng kháng sinh, nâng cao chất lượng và an toàn sinh học cho loài cá nuôi có giá trị kinh tế cao này.

Từ khóa: Weissellosis, bệnh mới, chẩn đoán, cá hồi, liệu pháp thực khuẩn thể.

A newly emerging bacterial pathogen caused outbreaks of rainbow trout worldwide and phage therapy

Truong Dinh Hoai, Nguyen Van Tuyen,
Nguyen Thi Huong Giang, Kim Van Van

SUMMARY

This study was conducted to isolate the pathogens and to screen the bacteriophage (phage) for therapeutic application. A total of 36 *W. cети* strains were isolated successfully from the diseased fish and confirmed by biochemical tests, 16S rRNA and PCR assay. Herein, in the first time, the Pwr-1 phase was screened and isolated successfully, which is a novel virulent bacteriophage pathogen as a good candidate for therapeutic application. The phage belonged to the family of *Siphoviridae*, possessed an isometric head approximately 65nm in diameter and a flexible, non-contractile tail of 170-180 nm in length. Latent time and burst size of phage was about 25 min and 16 PFU/ infected cell, respectively. Phage exhibited to be relatively stable with wide range of pH and temperature. Phage had wide host range, lysed all 36/36 tested *W. cети* strains. This is the first study to investigate a virulent bacteriophage of newly emerging pathogen infecting rainbow trout with various features making it become a highly potential agent for the therapeutic application in the future alternatives for antibiotic uses.

Keywords: Weissellosis, emerging disease, diagnosis, Rainbow trout, phage therapy.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Weissellosis là một bệnh nguy hiểm, mới

xuất hiện và gây ra bởi vi khuẩn *Weissella cети* trên cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*), chúng đã được báo cáo ở Trung Quốc, Brazil, Hoa Kỳ và Nhật Bản (Liu, Li *et al.*, 2009; Figueiredo *et*

¹. Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

². Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³. Khoa Nông nghiệp, Đại học Miyazaki, Nhật Bản

al., 2012; Welch và Good, 2013; Mitomi *et al.*, 2018). Sự xuất hiện của *W. cети* trên 3 lục địa khác nhau cho thấy rằng *W. cети* là một tác nhân gây bệnh nguy hiểm mới, cần phải tập trung vào việc ngăn chặn sự lây lan của nó để phát triển bền vững ngành công nghiệp nuôi cá hồi.

Bệnh Weissellosis chủ yếu ảnh hưởng đến cá trưởng thành (0,5 - 1,0 kg) và tỷ lệ tử vong của cá nhiễm bệnh tăng cao hơn khi lượng cơ thể cá tăng. Cá bị nhiễm bệnh thường có dấu hiệu: lồi mắt, xuất huyết ở mắt, mang và xương nắp mang, miệng, hậu môn, đường ruột, xoang bụng và gan (Figueiredo *et al.*, 2012; Welch *et al.*, 2013; Welch và Good, 2013). Do đó bệnh Weissellosis gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho người nuôi cá hồi vẫn ở nhiều nước. Các chủng phân lập từ các quốc gia khác nhau có sự tương đồng cao về trình tự gen 16S rRNA và bệnh này được dự đoán sẽ trở thành một vấn đề lớn đối với ngành công nghiệp cá hồi trong tương lai (Figueiredo *et al.*, 2015; Woo và Cipriano, 2017).

Từ lâu, thực khuẩn thể đã được sử dụng như một giải pháp khả thi, an toàn và có hiệu quả tốt để thay thế kháng sinh trong điều trị một số bệnh do vi khuẩn gây ra trong nuôi trồng thủy sản (Oliveira *et al.*, 2012). Gần đây, một số thực khuẩn thể *Weissella* đã được nghiên cứu như thực khuẩn thể $\Phi 22$ lây nhiễm trên vi khuẩn *W. cibaria* có trong xúc xích heo lên men tại Thái Lan (Pringsulaka *et al.*, 2011), hay các loại thực khuẩn thể $\Phi 3.8.18$, $\Phi 7.2.50$ và $\Phi 3.8.43$ tấn công vi khuẩn *W. cibaria* có trong quá trình lên men dưa chuột (Lu *et al.*, 2012; Kot, Neve *et al.*, 2014). Việc nghiên cứu và tìm ra thực khuẩn thể có khả năng chống lại vi khuẩn *Weissella cети* gây bệnh trên cá hồi vẫn có thể mang đến một giải pháp an toàn và hiệu quả trong việc hạn chế sự lây lan và ảnh hưởng của bệnh Weissellosis ở nhiều nơi bởi lẽ các chủng vi khuẩn gây bệnh có độ tương đồng rất cao về bộ gen. Điều này góp phần quan trọng vào sự thành công của ngành nuôi cá hồi nói riêng và ngành nuôi cá nước lạnh của thế giới nói chung.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập, nuôi cấy và định danh vi khuẩn

Các mẫu cá hồi bệnh được phân lập từ các trại cá hồi từ năm 2012 đến năm 2016 tại các trang trại khu vực Kyushu, Nhật Bản. Các thông tin liên quan về trọng lượng cá, các biểu hiện bệnh tích bên ngoài và bên trong cơ thể cá bệnh cũng như các điều kiện môi trường tại thời điểm thu mẫu được ghi chép. Vi khuẩn gây bệnh được phân lập từ thận của cá bệnh, sau đó nuôi cấy trên thạch ToddHewitt (Difco) bổ sung 5% máu cừu (thạch máu THA). Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập được bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ -80°C . Tổng cộng có 36 chủng vi khuẩn phân lập đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Ngoài ra, 1 chủng vi khuẩn *W. cети* (CECT7719) phân lập được từ cá voi mõm khoằm (Vela, Fernández *et al.*, 2011), 2 chủng vi khuẩn *W. cibaria* (VN16-10 và VN16-11) phân lập từ cá trắm cỏ tại Việt Nam và được cung cấp bởi Bộ môn Môi trường và Bệnh thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và chủng vi khuẩn *L. lactis sub.lactis* ATCC19435 (Schleifer *et al.*, 1985) được sử dụng làm đối chứng trong các thí nghiệm (bảng 1).

Các chủng vi khuẩn gây bệnh được quan sát hình thái, kiểm tra các phản ứng sinh hóa và phân tích gen. Hình thái của các chủng vi khuẩn được xác định bằng cách nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại từ 400 - 1000 lần. Các chủng vi khuẩn này và chủng vi khuẩn *W. cети* CECT7719 được nuôi cấy trên thạch máu THA, sau đó thử các phản ứng sinh hóa bằng bộ test API 20 STREP theo hướng dẫn của nhà xuất BioMérieux, Pháp. Kết quả được so sánh với chủng vi khuẩn *W. cети* NC36 (Ladner, Welch *et al.*, 2013) đã được công bố.

Bộ gen DNA của chủng vi khuẩn được tách chiết bằng cách sử dụng InstaGene Matrix theo hướng dẫn của nhà sản xuất Bio-Rad Laboratories, USA. Gen

Bảng 1. Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu

Loài vi khuẩn	Tên chủng	Nguồn phân lập	Năm phân lập
<i>W. ceti</i>	WM1	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM2	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM3	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM4	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM5	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM6	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM7	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM8	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM9	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM10	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM11	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM12	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM13	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM14	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM15	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM16	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM17	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM18	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM19	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM20	Cá hồi vân	2012
<i>W. ceti</i>	WM21	Cá hồi vân	2014
<i>W. ceti</i>	WM22	Cá hồi vân	2014
<i>W. ceti</i>	WM23	Cá hồi vân	2014
<i>W. ceti</i>	WM24	Cá hồi vân	2014
<i>W. ceti</i>	WM25	Cá hồi vân	2014
<i>W. ceti</i>	WM26	Cá hồi vân	2014
<i>W. ceti</i>	WM27	Cá hồi vân	2014
<i>W. ceti</i>	WM28	Cá hồi vân	2014
<i>W. ceti</i>	WM29	Cá hồi vân	2015
<i>W. ceti</i>	WM30	Cá hồi vân	2015
<i>W. ceti</i>	WM31	Cá hồi vân	2015
<i>W. ceti</i>	WM32	Cá hồi vân	2016
<i>W. ceti</i>	WM33	Cá hồi vân	2016
<i>W. ceti</i>	WM34	Cá hồi vân	2016
<i>W. ceti</i>	WM35	Cá hồi vân	2016
<i>W. ceti</i>	WM36	Cá hồi vân	2016
<i>W. ceti</i>	CECT7719	Cá voi mõm khoằm	2010
<i>W. cibaria</i>	VN16-10	Cá trắm cỏ	2016
<i>W. cibaria</i>	VN16-11	Cá trắm cỏ	2016
<i>L.lactis sub.lactis</i>	ATCC19435	-	-

16S rRNA được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp môi 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1525r (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Lane, 1991), sau đó sản phẩm PCR tinh khiết được giải trình tự. Các chủng vi khuẩn được định danh dựa trên sự tương đồng so với các gen 16S rRNA đã công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank. Cây phả hệ của các chủng vi khuẩn này được xây dựng bằng cách so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chúng với các trình tự gen 16S rRNA của các loài *Weissella* khác nhau được lấy từ GenBank bằng công cụ ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), sau đó cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp của Saitou và Nei (1987) trong phần mềm Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Hai cặp môi đã được thiết kế để xác định chính xác họ *Weissella* và loài *W. ceti* từ kết quả nghiên cứu của Snyder *et al.* (2015) để xác định nhanh chóng bệnh do *W. ceti* trên cá hồi vân ở Hoa Kỳ, được sử dụng để kiểm tra mức độ chính xác của các chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu này.

2.2. Phát hiện, phân lập và định danh thực khuẩn thể

Trong quá trình phân lập vi khuẩn gây bệnh Weissellosis trên cá hồi vân và sàng lọc thực khuẩn thể, đã phát hiện các đốm thực khuẩn thể xuất hiện, phát triển trong vùng phát triển của vi khuẩn *W. ceti* và chúng có khả năng tiêu diệt mầm bệnh *W. ceti* đã được phân lập. Các đốm thực khuẩn thể này sau đó được phân lập bằng cách ngâm trong dung dịch đệm SM (100 mM/L NaCl, 7 mM/L MgSO₄.7 H₂O; 50 mM/L Tris-HCl, pH 7,5; và 0,01% w/v gelatin), và ủ ở nhiệt độ 25°C trong 7 giờ. Dung dịch được ly tâm lạnh 10.000 vòng/phút trong thời gian 3 phút ở nhiệt độ 4°C, thu dịch nổi và lọc qua màng lọc 0,45 µm. Sự hiện diện của các thực khuẩn thể được xác nhận một lần nữa bằng cách nhỏ 5µl thực khuẩn thể lên đĩa thạch máu THA đã trang đều vi khuẩn của *W. ceti*. Thực khuẩn thể được phân lập bằng phương pháp thạch hai lớp và được lặp lại 3 lần để đảm bảo độ thuần và tinh sạch của thực khuẩn thể (Adams, 1959).

Hình thái ngoài của thực khuẩn thể sau khi phân lập được xác định bằng cách nhuộm âm bản với 2% uranyl acetate, sau đó quan sát dưới kính hiển vi điện

tử quét JEM-2010 MX (JEOL, Nhật Bản) với điện áp 100 kV. Kích thước của thực khuẩn thể được xác định là kích thước trung bình của năm phép đo độc lập.

2.3. Thời gian lây nhiễm và phổ diệt khuẩn của Pwr-1

Để xác định khoảng thời gian tiềm tàng (thời gian xâm nhập, tổng hợp và lắp ghép các thành phần) của thực khuẩn thể và số lượng thực khuẩn thể được giải phóng sau khi lây nhiễm, dung dịch chứa vi khuẩn *W. ceti* có mật độ OD 0,8 ở 600 nm (trương đương mật độ 10⁸ tế bào/mL) được chuẩn bị. Thực khuẩn thể được thêm vào với tỷ lệ khoảng 1 thực khuẩn thể/1 tế bào vi khuẩn. Thực khuẩn thể được lây nhiễm ở nhiệt độ 25°C trong 5 phút. Dung dịch sau đó được ly tâm ở 12.000 vòng trong 1 phút ở nhiệt độ 4°C để loại bỏ các thực khuẩn thể chưa lây nhiễm. Phần lắng dưới đáy của ống ly tâm được hòa tan trong 15 mL ToddHewitt broth (THB) và ủ ở nhiệt độ 25°C. Cứ 5 phút hút 1 ml dung dịch trong ống và ly tâm ngay lập tức trong 30 giây ở nhiệt độ 4°C, số lượng thực khuẩn thể trong dịch nổi được xác định bằng cách đếm số đốm thực khuẩn thể bằng phương pháp thạch hai lớp. Thí nghiệm được thực hiện độc lập 3 lần. Thời gian tiềm tàng (latent time) và số lượng thực khuẩn thể giải phóng ra được tính toán từ các đường cong sinh trưởng của thực khuẩn thể.

Để xác định phổ diệt khuẩn của thực khuẩn thể trong điều kiện *in vitro*, 36 chủng vi khuẩn *W. ceti* đã phân lập được từ cá bị bệnh Weissellosis, chủng *W. Ceti* CECT7719, hai chủng *Weissella cibaria* (VN 16-10 và VN16-11) và chủng vi khuẩn *L.lactis sub. lactis* ATCC19435 đã được sử dụng cho phép thử này (bảng 3). Nhỏ 5 µl dung dịch thực khuẩn thể có mật độ 10⁸ thực khuẩn thể/ml lên trên đĩa thạch máu THA đã trang đều các chủng vi khuẩn được lựa chọn ở trên. Các đĩa được ủ qua đêm ở nhiệt độ 25°C, khả năng diệt khuẩn của thực khuẩn thể được đánh giá bởi sự hình thành mảng thực khuẩn thể rõ ràng, trong suốt và không có sự hiện diện của vi khuẩn (vòng vô khuẩn). Ngoài ra, thời gian hình thành vòng vô khuẩn của Pwr-1 là yếu tố để đánh giá mức độ diệt khuẩn mạnh hay yếu của Pwr-1. Thời gian hình thành vòng vô khuẩn dưới 4 giờ: rất mạnh (++++); từ 4 - 8 giờ: khá mạnh (+++); từ 8 - 12 giờ: mạnh (++); trên 12 giờ: có khả năng diệt

khuẩn (+); không hình thành vòng vô khuẩn: không có khả năng diệt khuẩn (-).

2.4. Thử nghiệm khả năng tồn tại của thực khuẩn thể Pwr-1 trong điều kiện bất lợi

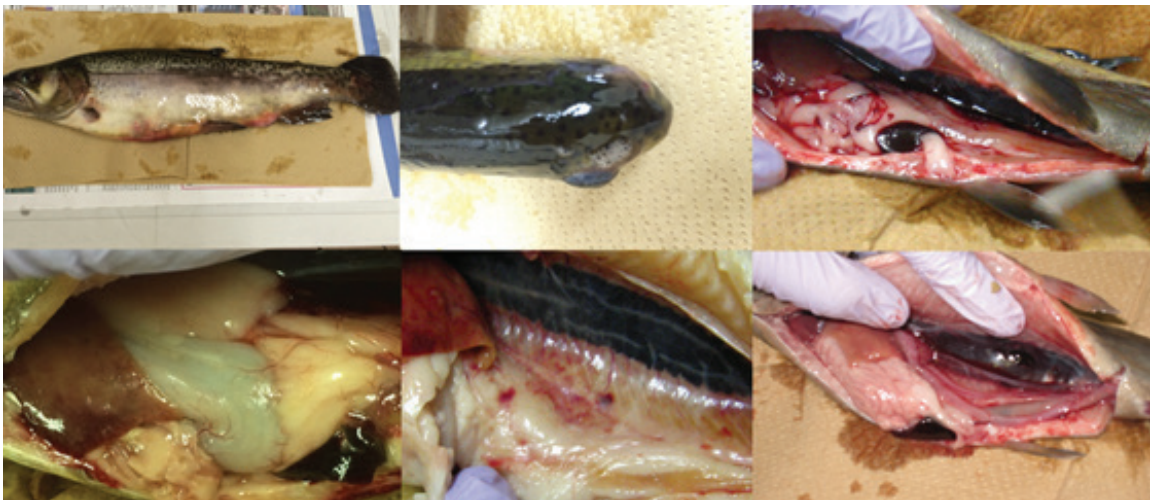
Để xác định khả năng tồn tại của thực khuẩn thể Pwr-1 ở các giá trị pH khác nhau, pH của dung dịch THB được điều chỉnh từ 1 đến 10 bằng cách sử dụng NaOH và HCl (Wako, Nhật Bản). Sau đó 100 μ l chứa thực khuẩn thể ở mật độ 2×10^{11} thực khuẩn thể/ml được cấy vào 9,9 ml môi trường được điều chỉnh pH (mật độ thực khuẩn thể cuối cùng xấp xỉ 2×10^9 thực khuẩn thể/ml). Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 25°C, tỷ lệ thực khuẩn thể còn hoạt động được xác định bằng cách xác định số lượng thực khuẩn thể còn tồn tại trong các điều kiện pH khác nhau sử dụng phương pháp thạch hai lớp. Khả năng chịu nhiệt của Pwr-1 được xác định bằng cách ủ thực khuẩn thể Pwr-1 ở các nhiệt độ khác nhau là 40, 50, 60, 70, 80 và 90°C trong 1 giờ. Tỷ lệ sống

của mỗi mẫu Pwr-1 đã xử lý được xác định sau mỗi khoảng thời gian 15, 30, 45 và 60 phút bằng cách sử dụng thí nghiệm thạch hai lớp của Adams (1959). Các đĩa thạch được ủ ở nhiệt độ 25°C qua đêm để quan sát sự phát triển của các mảng thực khuẩn thể, từ đó đánh giá khả năng tồn tại của thực khuẩn thể ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau. Tất cả các xét nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Dấu hiệu bệnh lý, phân lập và định danh vi khuẩn

Nhiệt độ nước tại thời điểm bùng phát bệnh được ghi nhận ở mức 16 - 20°C. Cá nhiễm bệnh có khối lượng cơ thể dao động từ 0,3 đến 1,5 kg và có các biểu hiện xuất huyết ở bên ngoài cơ thể và nội tạng (hình 1). Các dấu hiệu lâm sàng của bệnh gây ra bởi các tác nhân gây bệnh được phân lập khá giống với các tác nhân gây bệnh đã được báo cáo ở các quốc gia khác.

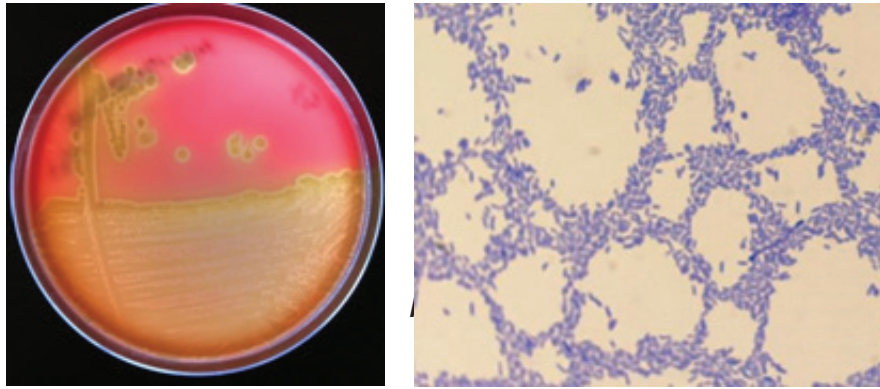


Hình 1. Dấu hiệu lâm sàng và bệnh tích của cá mắc bệnh Weissellosis

Vi khuẩn sau khi được phân lập phát triển mạnh trên thạch THA sau 48 giờ ủ ở nhiệt độ 25°C (hình 2a). Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy tất cả các vi khuẩn phân lập được là vi khuẩn Gram dương, hình que (hình 2b).

Kết quả thử nghiệm sinh hóa cho thấy 36 chủng vi khuẩn này là đồng nhất về mặt sinh hóa và chúng có sự tương đồng cao với cả hai

chủng *W. ceti* đối chứng (NC36 và CECT7719) về 19 trong số 20 chỉ tiêu sinh hóa được kiểm tra bằng bộ test API 20 STREP. 36 chủng vi khuẩn phân lập được và chủng CECT7719 là âm tính với chỉ tiêu arginine dihydrolase, ngược lại chủng NC36 dương tính với chỉ tiêu này. Trong khi đó chủng CECT7719 dương tính với chỉ tiêu thủy phân esculin, trong khi



Hình 2. Hình thái của vi khuẩn *W. ceti*

36 chủng vi khuẩn phân lập được và chủng NC36 là âm tính với chỉ tiêu thủy phân esculin (bảng 2).

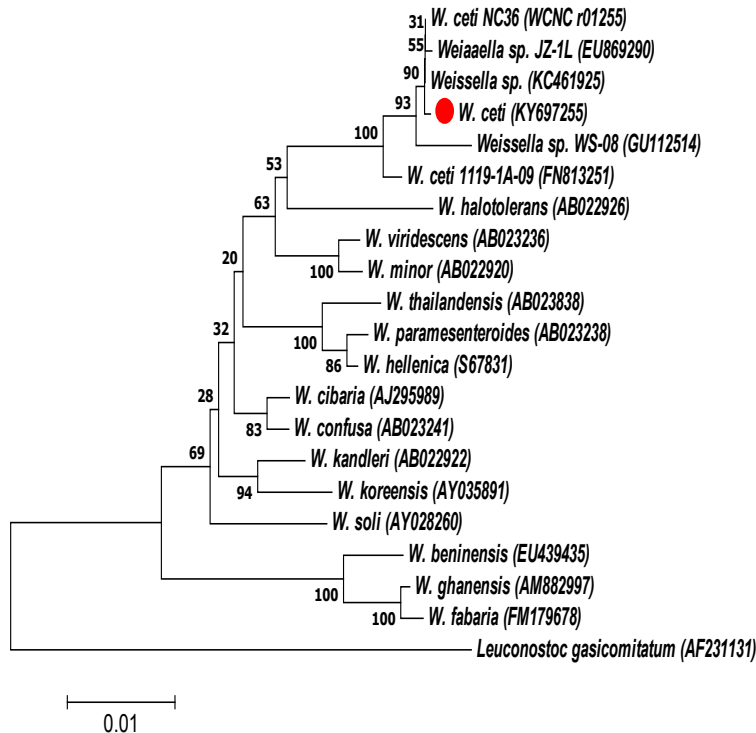
Bảng 2. Kết quả thử sinh hóa các chủng *Weissella ceti* phân lập từ cá hồi vân bị bệnh (n = 36)

Chỉ tiêu	36 chủng trong nghiên cứu này*	Chủng đối chứng	
		NC36**	CECT7719***
Pyruvate (Acetoin production)	+	+	+
Hippurate (Hydrolysis)	+	+	+
Esculin (β -glucosidase)	-	-	+
pyrrolidonyl-2-naphthylamide (Pyrrolidonylarylamidase)	-	-	-
6-Br-2-naphthyl- α -D- galactopyranoside (α -galactosidase)	-	-	-
naphthol AS-BI β -D- glucuronat (β -glucuronidase)	-	-	-
2-naphthyl- β -D- galactopyranoside (β -galactosidase)	-	-	-
2-naphthylphosphate (Alkaline phosphatase)	+	+	+
L-leucyl-2-naphthylamide (Leucinearylamidase)	+	+	+
Arginine (Arginine dehydrolase)	-	+	-
Ribose (acidification)	+	+	+
L-arabinose (acidification)	-	-	-
Mannitol (acidification)	-	-	-
Sorbitol (acidification)	-	-	-
Lactose (acidification)	-	-	-
Trehalose (acidification)	+	+	+
Inulin (acidification)	-	-	-
Raffinose (acidification)	-	-	-
Starch (acidification)	-	-	-
Glycogen (acidification)	-	-	-

(*) Bảng 1; (**) Chủng vi khuẩn phân lập từ cá hồi vân ở Mỹ, các chỉ tiêu hóa sinh đã được báo cáo (Welch và Good, 2013); (***) Chủng vi khuẩn phân lập từ cá voi mỏ khoằm ở Tây Ban Nha

Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA của 36 chủng cho thấy chúng có trình tự đoạn gen 16S rRNA có độ tương đồng rất cao (100%) với độ dài là 1.481 bp. Phân tích BLAST đoạn gen 16S rRNA cho thấy trình tự này tương đồng cao (tỷ lệ tương đồng 96% đến 99%) với các thành viên của loài

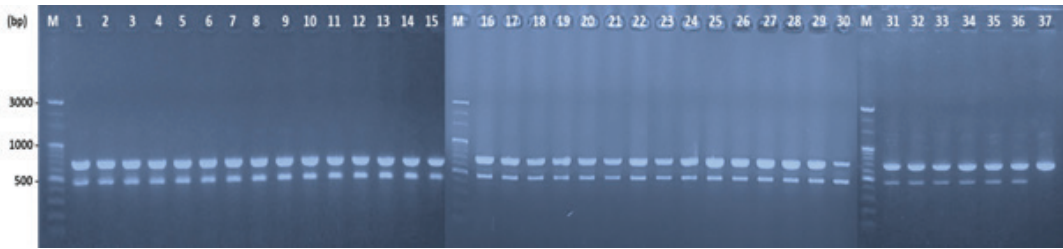
Weissella. Kết quả phân tích đoạn gen 16R rRNA và cây phả hệ cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được có sự tương đồng cao nhất với *Weissella* sp. gây bệnh ở Trung Quốc, Brazil và Mỹ ((Liu, Li *et al.*, 2009; Figueiredo, Costa *et al.*, 2012; Welch và Good, 2013) (hình 3).



Hình 3. Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự gen 16S rRNA của các chủng *Weissella* sp. chủng *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811 là đối chứng nhóm ngoài

Kết quả của xét nghiệm PCR cho thấy tất cả các chủng phân lập từ cá hồi vân gây bệnh Weissellosis trong nghiên cứu này đều có cả hai sản phẩm khuếch đại của đoạn gen 16S rRNA đặc trưng 725 bp và sản phẩm khuếch đại 500 bp là các đoạn gen đặc trưng và liên quan đến các yếu tố độc lực bao gồm collagen-like và platelet-associated adhesive proteins (hình 4). Vị trí gen đặc trưng có chiều dài 500 bp có trong bộ gen của chủng vi khuẩn *W. ceti* NC36 được phân lập từ cá hồi vân ở Hoa Kỳ (Welch *et al.*, 2013) nhưng không được phát hiện trong bộ gen của các loài vi

khẩn *Weissella* khác và bộ gen của chủng *W. ceti* CECT7719 phân lập từ cá voi mõm khoằm nên đã được sử dụng để xác nhận sự hiện diện của *W. ceti* trong sự bùng phát bệnh Weissellosis trên cá hồi vân (Snyder *et al.*, 2015). Những kết quả này chỉ ra rằng vi khuẩn gây bệnh Weissellosis trên cá hồi vân trong nghiên cứu này là *W. ceti*. Điều này cũng củng cố tính đặc hiệu của đoạn mồi sử dụng trong chẩn đoán *W. ceti* gây bệnh Weissellosis trên cá hồi vân bằng phương pháp PCR kép đã được công bố ở báo cáo trước đây (Snyder *et al.*, 2015).



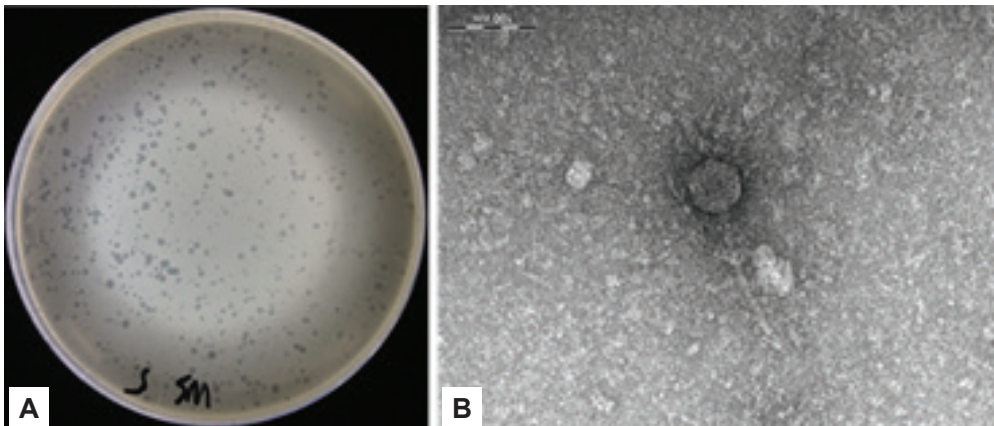
Hình 4. Kết quả kiểm tra PCR kép để xác định sự hiện diện của *W. ceti*

Giếng M: DNA tiêu chuẩn; Giếng 1-36: Lần lượt các chủng vi khuẩn *W. ceti* trong nghiên cứu này (bảng 1). Giếng 37: *W. ceti* CECT7719 được phân lập từ cá voi mỏ khoằm

3.2. Phân lập và định danh thực khuẩn thể Pwr-1

Đốm thực khuẩn thể Pwr-1 (vòng vô khuẩn do Pwr-1 tạo ra) có hình tròn, rõ ràng, trong suốt và không có sự hiện diện của vi khuẩn *W. ceti* với đường kính từ 0,7 - 2 mm (hình 5A). Hình

ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử cho thấy Pwr-1 có đường kính đầu khoảng 60 - 65 nm và đuôi hình trụ và linh hoạt với chiều dài khoảng 170 - 180 nm, chiều rộng 9 - 10 nm (hình 5B). Theo các đặc điểm hình thái và dựa trên sự phân loại của Ackermann (Ackermann, 2001), Pwr-1 thuộc về họ *Siphoviridae*.



Hình 5. Đốm thực khuẩn thể và hình thái học của thực khuẩn thể Pwr-1. thước: 100nm

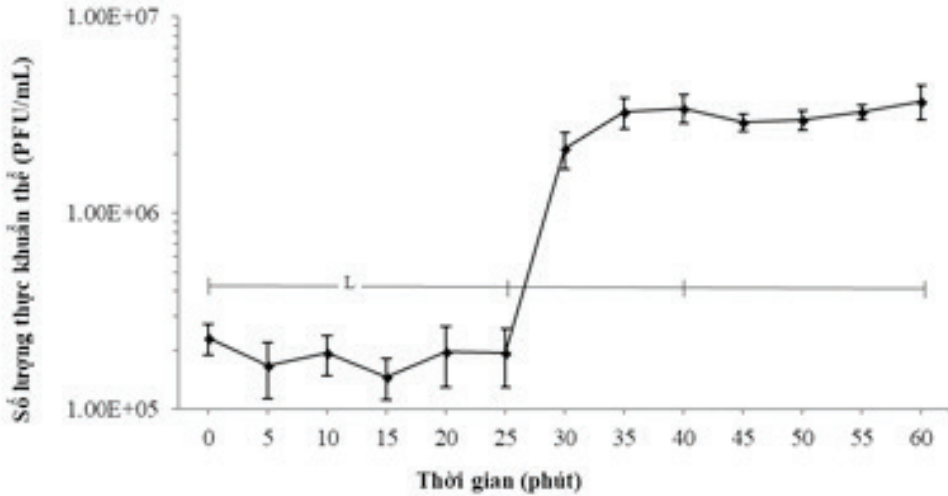
3.3. Thời gian lây nhiễm và khả năng diệt khuẩn của Pwr-1

Kết quả trong hình 6 cho thấy thời gian tiềm tàng của Pwr-1 được xác định là khoảng 25 phút và số lượng thực khuẩn thể được giải phóng là 16 thực khuẩn thể/tế bào bị nhiễm. Kết quả của thử nghiệm kiểm tra phổ diệt khuẩn cho thấy

rằng Pwr-1 có phổ diệt khuẩn rộng và có thể lây nhiễm trên tất cả các chủng *W. ceti* được phân lập (n = 36) từ cá hồi vân bị nhiễm bệnh trong nghiên cứu này. Pwr-1 không thể diệt chủng vi khuẩn *W. ceti* CECT7719 (phân lập từ cá voi mỏ khoằm), chủng *W. cibaria* (VN16-10 và VN16-11 phân lập từ cá trắm cỏ) và *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC19435 (bảng 3).

Bảng 3. Các chủng vi khuẩn được sử dụng để xác định phổ diệt khuẩn của Pwr-1

Loài vi khuẩn	Tên chủng	Nguồn phân lập	Năm phân lập	Kết quả kiểm tra
<i>W. ceti</i>	WM1	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM2	Cá hồi vân	2012	++++
<i>W. ceti</i>	WM3	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM4	Cá hồi vân	2012	++
<i>W. ceti</i>	WM5	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM6	Cá hồi vân	2012	++++
<i>W. ceti</i>	WM7	Cá hồi vân	2012	++
<i>W. ceti</i>	WM8	Cá hồi vân	2012	++
<i>W. ceti</i>	WM9	Cá hồi vân	2012	++++
<i>W. ceti</i>	WM10	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM11	Cá hồi vân	2012	++
<i>W. ceti</i>	WM12	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM13	Cá hồi vân	2012	++
<i>W. ceti</i>	WM14	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM15	Cá hồi vân	2012	++++
<i>W. ceti</i>	WM16	Cá hồi vân	2012	++
<i>W. ceti</i>	WM17	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM18	Cá hồi vân	2012	++
<i>W. ceti</i>	WM19	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM20	Cá hồi vân	2012	+++
<i>W. ceti</i>	WM21	Cá hồi vân	2014	++++
<i>W. ceti</i>	WM22	Cá hồi vân	2014	+++
<i>W. ceti</i>	WM23	Cá hồi vân	2014	++
<i>W. ceti</i>	WM24	Cá hồi vân	2014	+++
<i>W. ceti</i>	WM25	Cá hồi vân	2014	++
<i>W. ceti</i>	WM26	Cá hồi vân	2014	++++
<i>W. ceti</i>	WM27	Cá hồi vân	2014	++++
<i>W. ceti</i>	WM28	Cá hồi vân	2014	++
<i>W. ceti</i>	WM29	Cá hồi vân	2015	+++
<i>W. ceti</i>	WM30	Cá hồi vân	2015	++
<i>W. ceti</i>	WM31	Cá hồi vân	2015	++++
<i>W. ceti</i>	WM32	Cá hồi vân	2016	+++
<i>W. ceti</i>	WM33	Cá hồi vân	2016	++
<i>W. ceti</i>	WM34	Cá hồi vân	2016	+++
<i>W. ceti</i>	WM35	Cá hồi vân	2016	+++
<i>W. ceti</i>	WM36	Cá hồi vân	2016	++++
<i>W. ceti</i>	CECT7719	Cá voi mõm khoằm	2010	-
<i>W. cibaria</i>	VN16-10	Cá trắm cỏ	2016	-
<i>W. cibaria</i>	VN16-11	Cá trắm cỏ	2016	-
<i>L.lactis sub.lactis</i>	ATCC19435	-	-	-

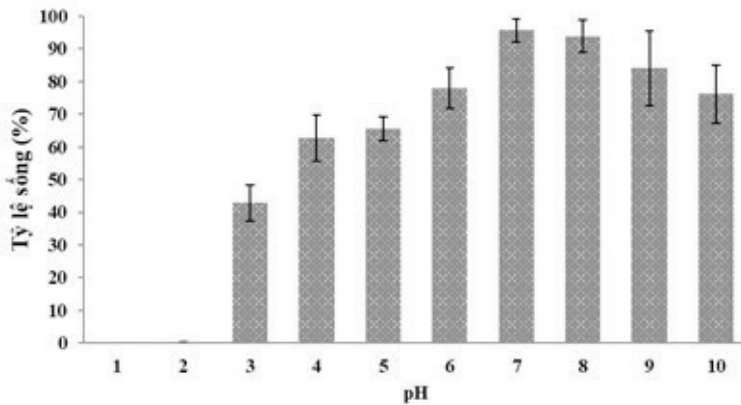


Hình 6. Khả năng tăng trưởng của Pwr-1. Thời gian tiềm tàng và số lượng thực khuẩn thể Pwr-1 được giải phóng. L: pha tiềm tàng; R: pha sinh trưởng và P: pha đỉnh

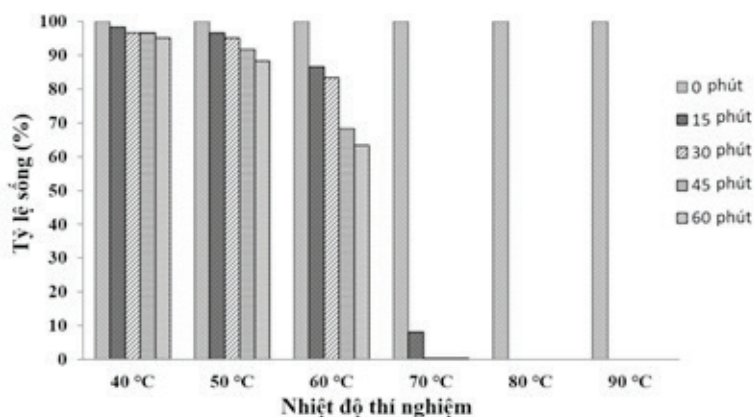
3.4. Khả năng tồn tại của Pwr-1 trong điều kiện bất lợi

Kết quả thử nghiệm khả năng tồn tại của Pwr-1 ở các giá trị pH khác nhau cho thấy Pwr-1 có khả năng chịu đựng tốt với khoảng pH rộng. Cụ thể, Pwr-1 phát triển tốt nhất ở khoảng pH 7,0 và tồn tại ở một loạt các giá trị pH khác với hơn 60% Pwr-1 có thể hoạt động ở pH 4 - 10 và hơn 40% ở pH 3,0. Đặc biệt, một vài thực khuẩn thể Pwr-1 vẫn có thể tồn tại ở pH 2,0. Tuy nhiên, các thực khuẩn thể hoàn toàn bị mất khả năng lây nhiễm ở pH 1,0 (hình 7). Kết quả kiểm tra khả năng chịu nhiệt (hình 8) cho thấy

Pwr-1 chịu đựng khá tốt với khoảng nhiệt độ từ 40 đến 60°C, với hơn 90% sống ở khoảng nhiệt độ 40 - 50°C và 63,3% sống ở nhiệt độ 60°C sau 1 giờ. Mật độ thực khuẩn thể giảm nhanh chóng ở nhiệt độ 70°C (giảm 90% sau 15 phút) và không phát hiện thấy Pwr-1 tồn tại sau 30 phút ở nhiệt độ này. Ở nhiệt độ 80°C và 90°C, không phát hiện thấy Pwr-1 còn tồn tại sau 15 phút. Việc Pwr-1 có phổ diệt khuẩn khá rộng, khả năng hoạt động trong khoảng pH rộng và tồn tại ở khoảng nhiệt độ lên tới 60°C mở ra khả năng sử dụng Pwr-1 trong điều trị bệnh do vi khuẩn *W. ceti* trên cá hồi vân.



Hình 7. Khả năng chống chịu của Pwr-1 ở môi trường có độ pH khác nhau



Hình 8. Khả năng chịu nhiệt của Pwr-1

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong nghiên cứu đã phân lập được 36 chủng vi khuẩn *W. cети* trên cá hồi vân bị nhiễm bệnh Weissellosis có triệu chứng bệnh được mô tả và tác nhân vi khuẩn gây bệnh có sự tương đồng cao về mặt di truyền với các chủng *W. cети* gây bệnh trên cá hồi vân đã phân lập được ở các nước khác nhau trên thế giới.

Lần đầu tiên, thực khuẩn thể (Pwr-1) được phân lập thành công có khả năng tiêu diệt mầm bệnh *W. cети*. Pwr-1 có thời gian tiềm tàng ngắn, số lượng thực khuẩn thể được giải phóng tương đối cao, khả năng chịu đựng với khoảng pH rộng, nhiệt độ cao, có phổ diệt khuẩn rộng và khả năng diệt khuẩn rất mạnh. Những kết quả này cho thấy Pwr-1 có nhiều tính năng thuận lợi và có triển vọng cao để sử dụng trong điều trị bệnh Weissellosis trên cá hồi vân.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu thử nghiệm phương pháp sử dụng thực khuẩn thể cho kết quả điều trị cao nhất ở quy mô phòng thí nghiệm và áp dụng ở thực tế tại các trại nuôi cá hồi vân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ackermann, H.-W. (2001). "Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000." *Archives of virology* 146(5): 843-857.
- Adams, M. H. (1959). "Bacteriophages." Interscience, New York.
- Figueiredo, H., F. Costa, C. Leal, G. Carvalho-Castro and R. Leite (2012). "*Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil." *Veterinary Microbiology* 156(3-4): 359-366.
- Figueiredo, H. C., S. C. Soares, F. L. Pereira, F. A. Dorella, A. F. Carvalho, J. P. Teixeira, V. A. Azevedo and C. A. Leal (2015). "Comparative genome analysis of *Weissella cети*, an emerging pathogen of farm-raised rainbow trout." *BMC genomics* 16(1): 1095.
- Kot, W., H. Neve, K. J. Heller and F. K. Vogensen (2014). "Bacteriophages of leuconostoc, oenococcus, and weissella." *Frontiers in microbiology* 5: 186.
- Ladner, J. T., T. J. Welch, C. A. Whitehouse and G. F. Palacios (2013). "Genome sequence of *Weissella cети* NC36, an emerging pathogen of farmed rainbow trout in the United States." *Genome announcements* 1(1): e00187-00112.
- Lane, D. (1991). "16S/23S rRNA

- sequencing.” Nucleic acid techniques in bacterial systematics: 115-175.
8. Liu, J. Y., A. H. Li, C. Ji and W. M. Yang (2009). “First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China.” *Veterinary microbiology* 136(3-4): 314-320.
 9. Lu, Z., I. M. Perez-Diaz, J. S. Hayes and F. Breidt (2012). “Bacteriophage ecology in a commercial cucumber fermentation.” *Applied and environmental microbiology*: AEM. 01914-01912.
 10. Marancik, D. P., T. J. Welch, T. D. Leeds and G. D. Wiens (2013). “Acute mortality, bacterial load, and pathology of select lines of adult rainbow trout challenged with *Weissella* sp. NC36.” *Journal of aquatic animal health* 25(4): 230-236.
 11. Mitomi, K., T. Hoai, I. Nishiki and T. Yoshida (2018). “First isolation of *Weissella ceti* responsible for outbreaks of weissellosis in farmed rainbow trout in Japan.” *Journal of fish diseases* 41(5): 847-850.
 12. Oliveira, J., F. Castilho, A. Cunha and M. Pereira (2012). “Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture.” *Aquaculture International* 20(5): 879-910.
 13. Pringsulaka, O., N. Patarasinpaiboon, N. Suwannasai, W. Atthakor and A. Rangsiruji (2011). “Isolation and characterisation of a novel Podoviridae-phage infecting *Weissella cibaria* N 22 from Nham, a Thai fermented pork sausage.” *Food microbiology* 28(3): 518-525.
 14. Saitou, N. and M. Nei (1987). “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.” *Molecular biology and evolution* 4(4): 406-425.
 15. Schleifer, K., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Bälz, M. Collins and W. Fischer (1985). “Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov.” *Systematic and Applied Microbiology* 6(2): 183-195.
 16. Snyder, A., J. Hinshaw and T. Welch (2015). “Diagnostic tools for rapid detection and quantification of *Weissella ceti* NC 36 infections in rainbow trout.” *Letters in applied microbiology* 60(2): 103-110.
 17. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). “MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.” *Molecular biology and evolution* 30(12): 2725-2729.
 18. Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). “CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.” *Nucleic acids research* 22(22): 4673-4680.
 19. Vela, A. I., A. Fernández, Y. B. de Quirós, P. Herráez, L. Domínguez and J. F. Fernández-Garayzábal (2011). “*Weissella ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Mesoplodon bidens*).” *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61(11): 2758-2762.
 20. Welch, T. J. and C. M. Good (2013). “Mortality associated with Weissellosis (*Weissella* sp.) in USA farmed rainbow trout: potential for control by vaccination.” *Aquaculture* 388: 122-127.
 21. Woo, P. T. and R. C. Cipriano (2017). *Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection*, CABI.

Ngày nhận 19-8-2018

Ngày phản biện 26-11-2018

Ngày đăng 1-3-2019