

BDELOVIBRIO BL1 CÓ KHẢ NĂNG LÀM TAN VIBRIO CAMPBELLII PHÁT SÁNG PHÂN LẬP TỪ TÔM POST NUÔI

BDELOVIBRIO BL1 HAS DISSOLVED VIBRIO CAMPBELLII ISOLATED FROM CULTURE POST SHRIMP

Nguyễn Thị Anh Thu¹, Văn Hồng Cẩm¹, Lê Thành Cường²

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, trường Đại học Nha Trang

² Viện Nuôi trồng Thủy sản, trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Văn Hồng Cẩm (Email: camvh@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 17/12/2022; Ngày phân biện thông qua: 30/06/2023; Ngày duyệt đăng: 25/09/2023

TÓM TẮT

Bệnh phát sáng là một trong những bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm, đặc biệt là trong giai đoạn ấu trùng. Bệnh do vi khuẩn phát sáng gây ra, và phổ biến hơn hết là do nhóm vi khuẩn *Vibrios spp.*, trong đó *Vibrio campbellii* gây ra bệnh phát sáng có thể gây chết tôm với tỷ lệ cao. Nghiên cứu phân lập được 15 chủng phát sáng từ tôm thẻ và tôm sú giai đoạn ấu trùng nuôi ở Khánh Hòa, Ninh Thuận và Bình Thuận. Trong đó có 3 chủng vi khuẩn phát sáng *V. campbellii* (kí hiệu V1, V5 và V6) được định danh bằng cặp mồi chuyên biệt khuếch đại gen *toxR* cho chủng *V. campbellii*. Ngoài ra, chủng BALOs BL1 được phân lập từ ruột tôm thẻ khỏe mạnh được xác định thuộc chi *Bdellovibrionaceae*. Sau khi tiến hành thử nghiệm, BL1 có khả năng làm tan được chủng V1 và V6 trong môi trường lỏng sau 21 ngày và trên đĩa thạch hai lớp sau 7 ngày. Nhưng chủng BL1 không làm tan được chủng V5. Kết quả nghiên cứu mở ra khả năng ứng dụng các chủng BALOs trong kiểm soát các vi khuẩn gây bệnh trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: *Bdellovibrio*, *Vibrio campbellii*, bệnh phát sáng, đồng nuôi cấy

ABSTRACT

Luminous disease is one of the diseases causing serious damage to the shrimp farming industry, especially in the larval stage. The disease is caused by luminous bacteria, most commonly the group of bacteria *Vibrios spp.*, in which luminous *Vibrio campbellii* can cause serious mortality in shrimp. The study isolated 15 luminous strains from postlarvae cultured in Khanh Hoa, Ninh Thuan and Binh Thuan. In which, there are 3 strains of luminous *V. campbellii* (called V1, V5 and V6) identified by a pair of primers specifically amplifying the *toxR* gene for *V. campbellii*. In addition, strain BALOs BL1 was isolated from the intestines of healthy white-leg shrimp identified as belonging to the genus *Bdellovibrionaceae*. After testing, BL1 was able to dissolve strains V1 and V6 in liquid media after 21 days and on double-layer agar plates after 7 days. But strain BL1 did not dissolve strain V5. Research's results show the possibility of applying strains of BALOs in controlling pathogenic bacteria in aquaculture.

Key words: *Bdellovibrio*, *Vibrio campbellii*, luminous disease, co-culture

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bdellovibrio và các vi khuẩn săn mồi tương tự (BALOs: *Bdellovibrio* and other similar predatory bacteria hay *Bdellovibrio* and like organisms) là nhóm vi khuẩn săn mồi Gram âm nhỏ, có mặt khắp nơi trong môi trường nước và trên cạn [1]. Cho đến nay, BALOs được biết đến gồm các loài thuộc 5 họ khác nhau gồm *Bdellovibrionaceae*, *Peredibacteraceae*, *Bacteriovoraceae*, *Pseudobacteriovoraceae*, và

Halobacteriovoraceae [2]. BALOs có thể xâm chiếm bào chất và nhân lên bên trong vi khuẩn con mồi, phân giải chúng và tiếp tục tấn công những vi khuẩn khác. Điều này làm cho BALOs có khả năng ức chế mạnh mẽ các vi khuẩn không mong muốn tồn tại trong môi trường sống và nghiên cứu trị liệu [3] [4].

BALOs đã được nghiên cứu như một liệu pháp tự nhiên thay thế để phòng ngừa và kiểm soát bệnh vi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản. Các nghiên cứu cho thấy BALOs biển có khả

năng làm giảm mật độ *Vibrio parahaemolyticus* và *V. vulnificus* khi nuôi cấy trong môi trường lỏng (broth), trong nước biển và trong cơ thể hàu (*Crassostrea virginica*) ở điều kiện phòng thí nghiệm [5][6]. Năm 2017, các nhà khoa học Thái Lan và Mỹ đã công bố kết quả phân lập BALOs ứng dụng trong việc làm giảm độc tính của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây hội chứng gan tụy cấp ở tôm [7] a severe disease of shrimp, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND Vp. Ngoài ra, các nghiên cứu còn cho thấy tính di động của *V. cholera* có ảnh hưởng khi chúng bị tấn công bám dính bởi *Bdellovibrio bacteriovorus* [8].

Bệnh do vi khuẩn phát sáng là một trong những bệnh xuất hiện trong quá trình nuôi thủy sản và là nguyên nhân giảm sản lượng nuôi ở các trang trại nuôi tôm [9]. Bệnh phát sáng xuất hiện khi mất cân bằng sinh thái trong hệ thống nuôi, tạo điều kiện thuận lợi cho các loài vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* phát triển và gây bệnh [10]. Các loài vi khuẩn phát sáng ở tôm hàu ấu trùng và tôm lớn ở các trại giống và trại nuôi thường là *Photobacterium phosphorum*, *Photobacterium leiognathi*, *V. fischeri*, *V. campbelli*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. vulnificus* ... Trong đó, *Vibrio* spp. là các vi khuẩn phổ biến nhất, gây ra nhiều bệnh, cũng như ảnh hưởng đến tăng trưởng ở tôm Penaeid [11] [12] [13]. Những năm gần đây, *V. campbellii* được xác định có khả năng mang gen độc tính PirAB và có khả năng gây ra bệnh gan tụy cấp (AHPND) và cũng chỉ ra rằng chúng có thể lan truyền theo chiều ngang giữa các loài vi khuẩn (từ *V. parahaemolyticus* sang *V. campbellii*) trong các ao nuôi tôm [14]»ISSN»:»00448486»,»abstract»:»Toxins PirvpA and PirvpB were first described in 2014 from *Vibrio parahaemolyticus* (VP Nghiên cứu của Lê Hồng Phước và cs [15] đã ghi nhận tỷ lệ chết cao trên tôm thẻ và sú lên tới 96% sau 12 giờ cảm nhiễm với *V. campbellii* (LMG21363) liều 10^7 CFU/tôm trong khi 30% và 4% tỷ lệ chết được tìm thấy khi gây nhiễm cùng liều chủng *V. harveyi* (LMG11226) và *V. harveyi* (BB120).

Nghiên cứu này tập trung tìm ra dòng

BALOs có khả năng làm tan vi khuẩn *V. campbellii* gây bệnh phát sáng với mục đích tìm ra một phương pháp thay thế an toàn, hạn chế dịch bệnh trên tôm gây ra bởi vi khuẩn phát sáng, góp phần hạn chế tình trạng kháng thuốc kháng sinh đang ngày một gia tăng như hiện nay, từ đó phát triển ngành nuôi trồng thủy sản nói chung và ngành nuôi tôm nói riêng một cách an toàn, hiệu quả và bền vững

II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật dùng cho nghiên cứu bao gồm các mẫu tôm thẻ (*L. vannamei*) và sú (*P. monodon*) trong giai đoạn post có dấu hiệu bệnh tại trại giống và ruột tôm sú và tôm thẻ khỏe mạnh ở giai đoạn trưởng thành thu trong khu vực tỉnh Khánh Hòa, Ninh Thuận, Bình Thuận.

2. Phân lập vi khuẩn phát sáng

Các mẫu tôm thẻ (*L. vannamei*) và sú (*P. monodon*) trong giai đoạn post tại trại giống trong khu vực tỉnh Khánh Hòa, Ninh Thuận, Bình Thuận (n = 20) trong các trại giống có hiện tượng phát sáng về đêm, tôm có dấu hiệu biểu hiện bệnh: hoạt động yếu, bơi lơ dờ không định hướng, phản ứng chậm chạp, tôm chết rải rác...được thu và dùng trong phân lập vi khuẩn. Các mẫu tôm được vận chuyển (sục O₂ và vận chuyển lạnh) về phòng thí nghiệm và được dùng để phân lập *Vibrio* phát sáng. Tôm được rửa bằng nước biển vô trùng 3 lần; và nghiền trong eppendorf vô trùng; mẫu sau đó được cấy lên môi trường TCBS (Neogen, Mỹ), HiCrome *Vibrio* (Himedia, Ấn Độ) và môi trường Marine agar (Himedia, Ấn Độ) ở 25°C±2°C trong tủ nuôi cấy (Mettler INE – 500).

Quan sát khả năng phát sáng của các chủng vi khuẩn trong phòng tối. Các chủng phát sáng được làm thuần qua 3 lần cấy ria trên môi trường Marine agar [16]. Các chủng thuần được lưu trữ -80°C trong glycerol 20%.

3. Phân lập BALOs bằng vi khuẩn môi phát sáng

BALOs được tăng sinh từ ruột tôm sú, thẻ khỏe mạnh. Phương pháp tăng sinh BALOs được thực hiện theo phương pháp của Starr và

Medina và cs [17] [18] có cải tiến như sau: mẫu ruột tôm được nghiền và sau đó trộn vào 100ml môi trường dNB và 1ml *Vibrio* sp. phát sáng ($0,5 \times 10^8$ CFU/ml). Hỗn hợp được lắc với tốc độ 200 vòng/phút (Orbital Shaker – Labentech) ở 30°C trong 7 ngày. Sau đó, dịch tăng sinh được ly tâm lạnh 4°C ở tốc độ 7.000 vòng/phút trong 5 phút (Mega 17R, Hàn Quốc), phần dịch nổi được ly tâm qua màng lọc 0.45µm (Millipore). 5ml dịch lọc lại được thêm vào các bình 50ml dNB chứa dịch *Vibrio* phát sáng khác nhau ($0,5 \times 10^8$ CFU/ml). Hỗn hợp được nuôi trên máy lắc vòng, lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở 30°C. Theo dõi dịch nuôi cấy hàng ngày bằng việc đo độ đục bằng máy đo quang phổ (UV-VIS DR6000) và quan sát cận lẳng dưới đáy bình (sau 3 – 21 ngày nuôi cấy). Các bình dịch giảm độ đục sau thời gian nuôi cấy được ghi nhận là có khả năng có mặt BALOs

Sử dụng bình nuôi cấy có cận lẳng và trong (thay đổi độ đục sau thời gian tăng sinh) để thực hiện phương pháp đĩa thạch 2 lớp trên môi trường DNA theo phương pháp của Starr [17] very little is known about the mechanisms involved in predation. RESULTS: Host-Independent (HI: Ly tâm dịch nghi ngờ có sự xuất hiện của BALOs với tốc độ 7.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và lọc vô trùng qua màng lọc 0,45µm để thu dịch BALOs không chứa vi khuẩn môi (vi khuẩn phát sáng). 500µl hỗn hợp vi khuẩn phát sáng ($0,5 \times 10^8$ CFU/ml) được trộn đều cùng với 500µl dịch tăng sinh sau lọc bằng máy vortex. Sau đó, hút 500µl dịch hỗn hợp nói trên cấy trộn vào đĩa thạch DNA với phần thạch đáy cứng chứa 1,5% agar và phần thạch mềm phía trên chứa 0,8% agar. Đĩa thạch 2 lớp được ủ trong điều kiện nhiệt độ 30°C, quan sát và ghi nhận kết quả qua từng ngày. Sự hình thành vệt tan xuất hiện trong vòng 3 - 21 ngày, cho thấy sự hiện diện của BALOs ly giải vi khuẩn môi. Đĩa có 25 - 250 vệt tan được sử dụng cho bước làm thuần tiếp theo: dùng kim vô trùng tách vệt tan và làm thuần qua 3 thế hệ. Giữ chủng BALOs bằng cách sử dụng vệt tan đã thuần được tái huyền phù trong môi trường dNB mới và lưu giữ trong glycerol 25% ở tủ đông sâu - 80°C). Ngoài ra,

còn có thể lưu giữ BALOs trong tủ lạnh ở mức 4°C, tối đa trong vòng 1 tháng [19].

4. Định danh *Vibrio campbellii* phát sáng và BALOs

Các chủng vi khuẩn phát sáng và BALOs phân lập được tách chiết DNA bằng bộ kit cột DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen – Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với các bước sau: Lấy 1ml dung dịch vi khuẩn ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C, loại bỏ phần dịch nổi và rửa kết tủa với 400 µl nước muối 0,9% NaCl. Thêm 180 µl buffer ATL vào phần sinh khối thu đc rồi ủ mẫu ở 56°C. Khi mẫu ly giải hoàn toàn thêm 200 µl buffer AL và ủ mẫu 56°C trong 10 phút. Sau khi thêm 200µl ethanol (96 – 100%), hút hỗn hợp trên chuyển qua cột Dneasy tube 2ml và ly tâm 8.000 vòng/phút trong 3 phút, loại bỏ dịch phía dưới. Tiếp theo, cho 500 µl buffer AW1 và ly tâm 8.000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ dịch phía dưới. Cho tiếp 500µl buffer AW2, ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ dịch phía dưới. Cuối cùng, chuyển cột Dneasy qua ống eppendorf vô trùng, thêm 200µl buffer AE vào chính giữa cột và ly tâm 8.000 vòng/phút trong 1 phút để thu hồi DNA. Mẫu DNA được bảo quản ở -20°C. DNA vi khuẩn và BALOs được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các thành phần sau: 1X MyTaq PCR buffer (Bioline, Mỹ); 1U MyTaq DNA polymerase (Bioline, Mỹ); 10 pmol cho mỗi môi xuôi và mỗi ngược (Bảng 1); 2µl DNA tách chiết cần xác định. Tổng thể tích của phản ứng là 25 µl. Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose (1,5%) có chứa 1 µl ethidium bromide trong dung dịch trong dung dịch đệm TBE 1X ở 90V, 400A, thời gian 20 phút. Sản phẩm PCR được quan sát và đọc kết quả điện di dưới ánh sáng tử ngoại. Trình tự oligonucleotide của 2 cặp mồi đặc hiệu khuếch đại gen *toxR* của *V. campbellii* và gen 16S rDNA của BALOs, và kích thước băng tương ứng được trình bày ở Bảng 1. Cặp mồi VcatoxR-F và VcatoxR-R được khuếch đại với điều kiện phản ứng: 94°C trong 4 phút, tiếp theo 94°C trong 30 giây, 65°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây chu kỳ này được lặp lại 30 lần, cuối cùng 72°C trong 7 phút. Cặp

mồi Bde347F và Bde549R được khuếch đại với điều kiện phản ứng: 95°C trong 1 phút, tiếp theo 95°C trong 10 giây, 56°C trong 45 giây,

72°C trong 2 phút chu kỳ này được lặp lại 30 lần, cuối cùng 72°C trong 10 phút.

Bảng 1 Trình tự oligonucleotide của 2 cặp mồi

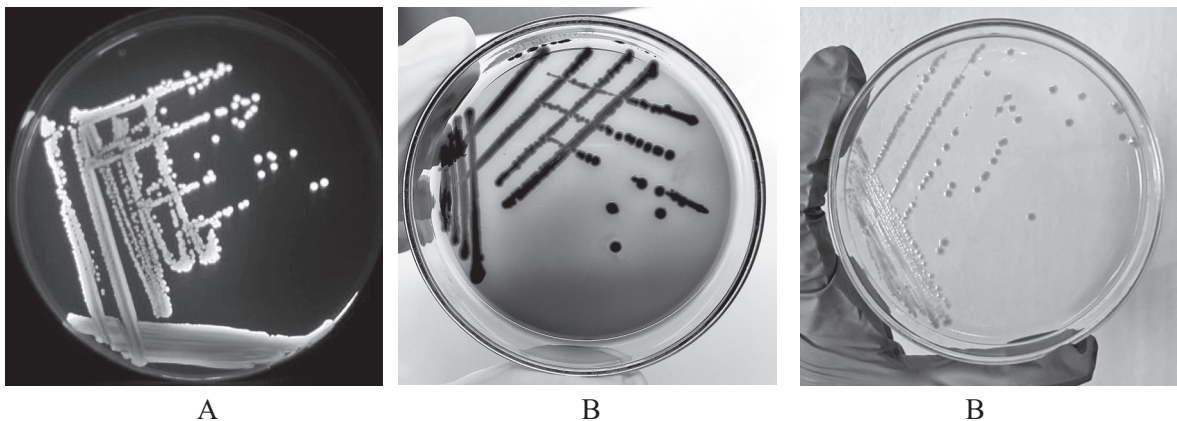
Tên mồi	Trình tự oligonucleotide	Kích thước	
VcatoxR-F	CCGCTTTCTGCTGACTCTACC	245bp	[20]
VcatoxR-R	GGCTTAGTCAACATCAGTACACAG		
Bde347F	GGAGGCAGCAGTAGGGAATA	203bp	[21]
Bde549R	GCTAGGATCCCTCGTCTTACC		

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn phát sáng

Bằng phương pháp nuôi cấy và phân lập vi khuẩn trên môi trường TCBS, HiCrome Vibrio và Marine agar; nghiên cứu đã phân lập và làm thuần được 15 chủng vi khuẩn có khả năng

phát sáng từ các trại tôm giống. Khuẩn lạc của các chủng đều có dạng tròn, đường kính 2 - 2,5 mm sau 18 - 24h nuôi cấy, màu xanh lá trên môi trường TCBS; màu xanh bích nhạt trên môi trường Hicrome Vibrio (Hình 1).



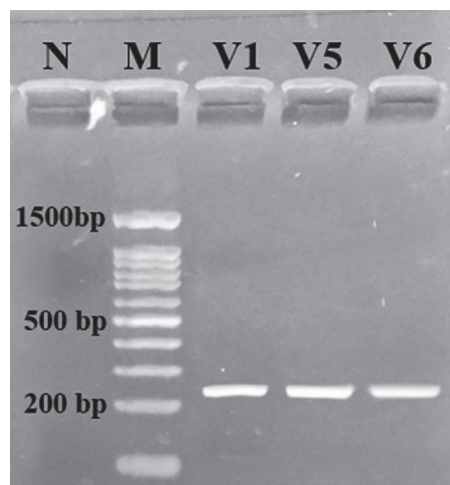
Hình 1: Vi khuẩn phát sáng trên các môi trường Marine agar (A); TCBS (B), Hicrome Vibrio (C).

2. Định danh *V. campbellii* phát sáng phân lập được

Sử dụng cặp mồi chuyên biệt VcatoxR-F và VcatoxR-R, nghiên cứu đã ghi nhận sự có mặt của 3/15 chủng phát sáng là *Vibrio campbellii* với kích thước băng mong muốn 245bp [20] (Hình 2). Các chủng *Vibrio campbellii* được mã hóa V1, V5 và V6. *V. campbellii* đã được tìm thấy và chứng minh là tác nhân gây bệnh trên *Artemia*, tôm thẻ (*L. vannamei*) [22], [23] và trên tôm sú (*P. monodon*) [24].

3. Phân lập BALOs bằng vi khuẩn môi phát sáng

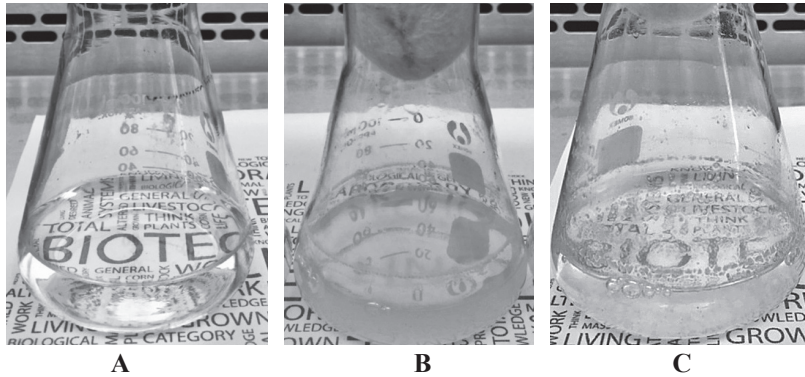
Quá trình tăng sinh đã chọn ra được hỗn hợp V1-dịch phân tách từ ruột tôm sú khỏe (gọi tắt là V1-BALOs) cho kết quả khả quan khi độ



Hình 2: Kết quả điện di: N là đối chứng âm; M: Marker; V1, V5 và V6 là sản phẩm PCR ToxR của 3 chủng vi khuẩn phát sáng.

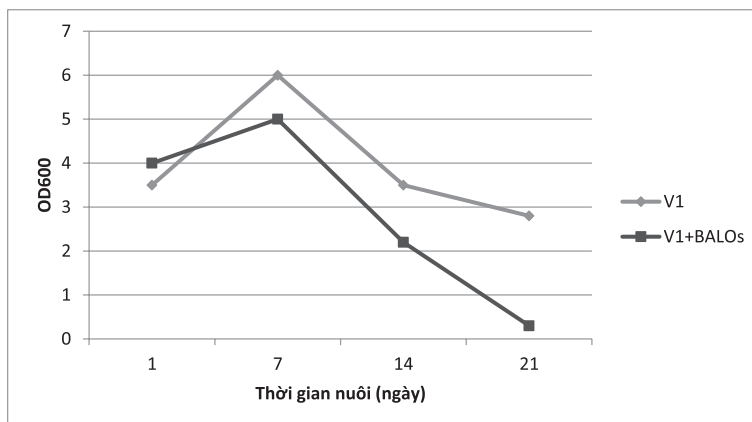
đục của hỗn hợp tăng sinh giảm theo thời gian nuôi cấy (Hình 3 và Hình 4). Sau 21 ngày, bình chứa V1-BALOs xuất hiện của các cặn tủa và môi trường trong hơn so với bình nuôi cấy V1

cho thấy các tế bào vi khuẩn *V. campbellii* V1 đã bị tan. Kết quả nuôi cấy trên đĩa thạch 2 lớp sau 7 ngày xuất hiện các vết tan rõ rệt với các kích thước khác nhau, đường kính của vết

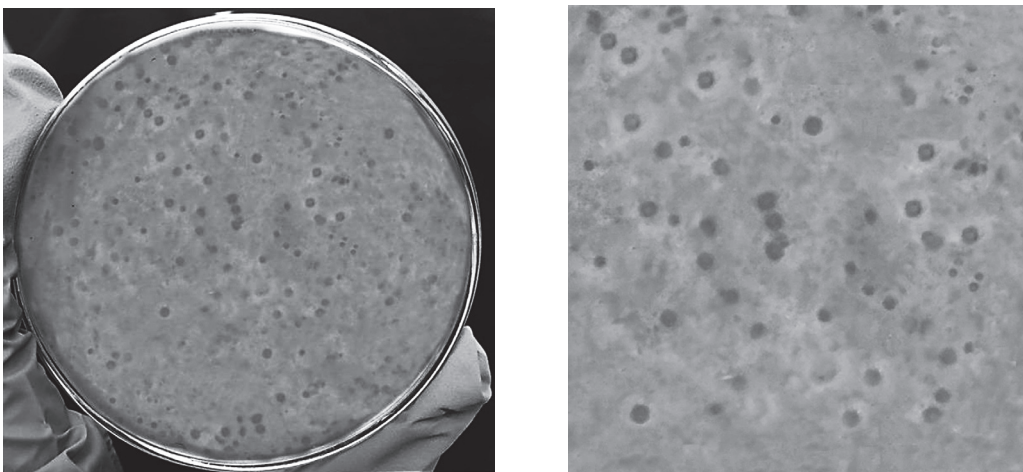


Hình 3: Kết quả tăng sinh BALOs sau 21 nuôi cấy trong hỗn hợp *Vibrio campbellii* V1

(A: mẫu môi trường dNB đối chứng; B: mẫu V1 nuôi trong dNB; C: mẫu BALOs tăng sinh trong môi trường dNB có *campbellii* V1)



Hình 4: Kết quả đo độ đục của dịch nuôi cấy BALOs theo thời gian



Hình 5: Kết quả hình thành vết tan sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường dNA bằng phương pháp đĩa thạch 2 lớp. A và B: chụp toàn đĩa chụp gần của vết tan V1+BL1.

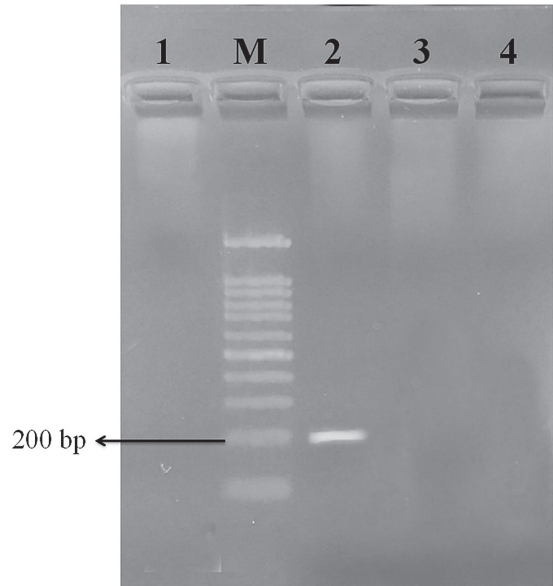
tan khoảng 2 - 4 mm (Hình 5). Dòng BALOs mã hóa tên BL1 được tách ra bằng kim và làm thuần qua 3 thế hệ trên đĩa thạch 2 lớp, sau đó được lưu trữ.

Các thử nghiệm khả năng làm tan của BL1 đối với các chủng *V. campbellii* còn lại trong nghiên cứu (V5, V6) được thực hiện. Kết quả thử nghiệm tác động của BL1 cho thấy BL1 cũng có khả năng làm tan *V. campbellii* V6 trong môi trường lỏng là 21 ngày và trên đĩa thạch là 7 ngày. Trong khi đó, chủng BL1 không thể làm tan *V. campbellii* V5 trong môi trường lỏng và trên đĩa thạch hai lớp trong thời gian tương ứng. Từ đó có thể thấy khả năng làm tan các chủng *V. campbellii* thử nghiệm bởi chủng BALOs BL1 là khác nhau nhưng BL1 có tiềm năng kiểm soát một số vi khuẩn *V. campbellii* gây bệnh phát sáng.

4. Định danh BALOs phân lập được

DNA của BL1 sau khi PCR cặp môi Bde347F và Bde549R được điện di cho ra băng sáng có kích thước khoảng 200bp phù hợp với kích thước của Paix đưa ra trong nghiên cứu [21] (Hình 6). Vậy chủng BALOs mà chúng tôi phân lập được BL1 bằng phương pháp đĩa thạch 2 lớp là loài thuộc họ Bdellovibrionaceae. Trong nghiên cứu của Van Essche cũng đã sử dụng cặp môi Bde347F, Bde549R để phát triển phương pháp định lượng (qPCR) Bdellovibrionaceae [25] và Paix và cộng sự đã xác định sự phân bố của Bdellovibrionaceae trong các hồ nước ở Pháp và Tây Âu [21] nhờ cặp môi này.

Nghiên cứu Varon và Shil [26] cũng thử nghiệm nuôi vi khuẩn *E. coli* cùng BALOs trên môi trường thạch dinh dưỡng 2 lớp (dNA). Kết quả, vệt tan xuất hiện sau 3 - 5 ngày, kích thước vệt tan khoảng 3 - 5 mm. Tương tự, nghiên cứu của Kongrueng và cs [7] cũng cho thấy BALOs tấn công chủng *V. parahaemolyticus* trên môi trường thạch dinh dưỡng 2 lớp (dNB + agar) qua sự hình thành vệt tan với các kích thước khác nhau, đường kính vệt tan khoảng 2 - 3 mm sau khi ủ 7 ngày ở 30°C. Gần đây, Tajabadi và cs [19] cũng đã phân lập được 2 dòng BALOs từ mẫu đất và mẫu nước ở Rafsanjan, tỉnh Kerman, Iran bằng cách sử dụng chủng *E. coli* K12 làm con môi trên môi trường thạch HM



Hình 6 Sản phẩm PCR 16S rDNA của BL1: (N) đối chứng âm; (M) Marker; (1) sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp môi Bde347F và Bde 549R;

hai lớp. Sau 3 - 8 ngày BALOs đã tấn công chủng *E. coli* K12 tạo các vệt tan có kích thước khác nhau. Từ đó, cho thấy kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với một số nghiên cứu trên. Hiện nay, các chế phẩm dạng lỏng của bdellovibrios được sử dụng trong tôm nuôi trồng thủy sản được thương mại hóa dưới dạng chất cải thiện chất lượng nước và được bán rộng rãi trên thị trường [27]. Nghiên cứu của Cao Haipeng và cs [28], bột Bdellovibrio được đóng gói thể hiện tính ổn định và bảo quản tốt với mật độ tế bào $3,5 \times 10^7$ PFU/g sau 120 ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng; chế phẩm an toàn đối với tôm chân trắng nuôi nước ngọt có LD50 trên 1200 mg/L, và có tác dụng kháng khuẩn và bảo vệ ở nồng độ 0,8 mg/L chống lại vibrio gây bệnh cho tôm.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 15 chủng phát sáng từ tôm thẻ và tôm sú ở giai đoạn tôm post nuôi ở Khánh Hòa, Ninh Thuận và Bình Thuận. Trong đó, 3 chủng phát sáng được xác định là *V. campbellii* bằng cặp môi chuyên biệt cho gen ToxR. Nghiên cứu cũng phân lập và làm thuần được 1 chủng BALOs BL1 có khả năng làm tan 2 chủng phát sáng *V. campbellii*

trong nghiên cứu. BL1 được xác định thuộc dòng Bdellovibrionaceae.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần của đề tài

TR2020-13-17 được thực hiện với nguồn kinh phí từ Trường Đại học Nha Trang. Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Trường Đại học Nha Trang đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. H. Chen, R. Athar, G. Zheng, and H. N. Williams, "Prey bacteria shape the community structure of their predators," *ISME J.*, vol. 5, no. 8, pp. 1314–1322, 2011, doi: 10.1038/ismej.2011.4.
2. M. W. Hahn *et al.*, "Silvanigrella aquatica gen. nov., sp. nov., isolated from a freshwater lake, description of Silvanigrellaceae fam. nov. and Silvanigrellales ord. nov., reclassification of the order Bdellovibrionales in the class Oligoflexia, reclassification of the family Pseudobacteriovoracaceae in the order Oligoflexales," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 67, no. 8, pp. 2555–2568, 2017, doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001965>.
3. P. Fratamico and P. Cooke, "Isolation of Bdellovibrios that prey on *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces.," *J Food Saf*, vol. 16, pp. 161–173, 1996.
4. R. E. Sockett and C. Lambert, "Bdellovibrio as therapeutic agents: A predatory renaissance?," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 8, pp. 669–675, 2004, doi: 10.1038/nrmicro959.
5. H. Williams *et al.*, "Halobacteriovorax, an underestimated predator on bacteria: Potential impact relative to viruses on bacterial mortality," *ISME J.*, vol. 10, Aug. 2015, doi: 10.1038/ismej.2015.129.
6. G. P. Richards, J. P. Fay, J. Kunalis, O. M. Olanya, and M. A. Watson, "Purification and host specificity of predatory Halobacteriovorax isolates from seawater.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 3, pp. 922–927, Feb. 2016, doi: 10.1128/AEM.03136-15.
7. J. Kongrueng, P. Mitraparp-Arthorn, K. Bangpanwimon, W. Robins, V. Vuddhakul, and J. Mekalanos, "Isolation of bdellovibrio and like organisms and potential to reduce Acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*," *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 124, no. 3, pp. 223–232, 2017, doi: 10.3354/dao03120.
8. M. C. Duncan *et al.*, "*Vibrio cholerae* motility exerts drag force to impede attack by the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus*," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 4757, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07245-3.
9. I. Karunasagar, R. Pai, G. R. Malathi, and I. Karunasagar, "Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection," *Aquaculture*, vol. 128, no. 3–4, pp. 203–209, 1994, doi: 10.1016/0044-8486(94)90309-3.
10. W. A. Setiawan, U. Widyastuti, and M. Yuhana, "Detection of luminous *Vibrio harveyi* in Penaeid shrimp through nested PCR using haemolysin gene primer," *HAYATI J. Biosci.*, vol. 22, no. 2, pp. 60–66, 2015, [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1978301916300754>.
11. D. Srinivas and C. Venkatrayulu, "Prevalence of Vibriosis in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in three different locations of Nellore district of Coastal Andhra Pradesh," *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, vol. 6, no. 11, pp. 28–33, Jan. 2019.
12. I. K. M. Chiew, A. M. Salter, and Y. S. Lim, "The significance of major viral and bacterial diseases in Malaysian aquaculture industry," *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, vol. 42, no. 3, pp. 1023–1047, 2019.
13. P. Dash, S. Avunje, R. Tandel, S. k p, and A. Panigrahi, "Biocontrol of Luminous Vibriosis in Shrimp Aquaculture: A Review of Current Approaches and Future Perspectives," *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, vol. 25, pp. 1–11, Jan. 2017, doi: 10.1080/23308249.2016.1277973.

14. P. Wangman, S. Longyant, S. Taengchaiyaphum, S. Senapin, P. Sithigorngul, and P. Chaivisuthangkura, "PirA & B toxins discovered in archived shrimp pathogenic *Vibrio campbellii* isolated long before EMS/AHPND outbreaks," *Aquaculture*, vol. 497, no. April, pp. 494–502, 2018, doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.025.
15. Lê Hồng Phước, Nguyễn Thị Hiền, Võ Hồng Phương, Phạm Nguyễn Hoàng Huy, Ngô Thị Bích Phương, và Nguyễn Trung Hiếu, "Độc lực của các chủng vibrio đối với tôm sú và tôm thẻ chân trắng," *Tap chí nghề cá sông Cửu Long*, vol. 2, pp. 83–92, 2013.
16. L. Wang, Y. Chen, H. Huang, Z. Huang, H. Chen, and Z. Shao, "Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*," *Aquac. Res.*, vol. 46, no. 2, pp. 395–404, 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/are.12191>.
17. A. A. Medina, R. M. Shanks, and D. E. Kadouri, "Development of a novel system for isolating genes involved in predator-prey interactions using host independent derivatives of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J.," *BMC Microbiol.*, vol. 8, p. 33, Feb. 2008, doi: 10.1186/1471-2180-8-33.
18. H. Stolp and M. P. Starr, "Bdellovibrio bacteriovorus gen. Et sp. N., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism.," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 29, pp. 217–248, 1963, doi: 10.1007/bf02046064.
19. F. H. Tajabadi, G. S. Juzani, and P. Khodaygan, "Introducing two isolates of *Bdellovibrio* from Iran-Rafsanjan," vol. 2019, pp. 107–116, 2019, doi: 10.22059/jbioc.2018.256406.229.
20. C. D. M. Castroverde, B. B. San Luis, R. G. Monsalud, and C. T. Hedreyda, "Differential detection of vibrios pathogenic to shrimp by multiplex PCR," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 273–280, 2006, doi: 10.2323/jgam.52.273.
21. B. Paix, J. A. Ezzedine, and S. Jacquet, "Diversity, Dynamics, and Distribution of *Bdellovibrio* and Like Organisms in Perialpine Lakes," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 85, no. 6, pp. e02494-18, Mar. 2019, doi: 10.1128/AEM.02494-18.
22. L. Phuoc *et al.*, "Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*," *Aquaculture*, vol. 290, pp. 61–68, 2009, doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.02.004.
23. L. Wang, Y. Chen, H. Huang, Z. Huang, H. Chen, and Z. Shao, "Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*," *Aquac. Res.*, vol. 46, no. 2, pp. 395–404, 2015, doi: 10.1111/are.12191.
24. M. Baticados, C. Lavilla-Pitogo, E. Cruz-Lacierda, L. de la Pena, and N. Sunaz, "Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water," *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 9, no. 1, pp. 133–139, 1990, doi: 10.3354/dao009133.
25. M. Van Essche *et al.*, "Development and performance of a quantitative PCR for the enumeration of *Bdellovibrionaceae*," *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 1, no. 4, pp. 228–233, 2009, doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00034.x.
26. M. Varon and M. Shil, "Interacton of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria. I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by *Bdellovibrio bacteriovorus*.,," *J. Bacteriol.*, vol. 95, no. 3, pp. 744–753, 1968, doi: 10.1128/jb.95.3.744-753.1968.
27. Qi, Z.; Zhang, X.; Boon, N.; Bossier, P. Probiotics in aquaculture of China-Current state, problems and prospect. *Aquaculture* 2009, 290, 15–21.
28. Cao, H.; Wang, H.; Yu, J.; An, J.; Chen, J. Encapsulated *Bdellovibrio* Powder as a Potential Bio-Disinfectant against Whiteleg Shrimp-Pathogenic Vibrios. *Microorganisms* **2019**, *7*, 244. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080244>