

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GIAO TIẾP (QUORUM SENSING) GIỮA VI KHUẨN GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP VỚI VIBRIO ALGINOLYTICUS

Trần Thị Thúy Hà*, Nguyễn Thị Hạnh, Phạm Thế Việt, Phan Thị Vân, Trương Thị Mỹ Hạnh

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I

*Tác giả liên hệ: thuyha@ria1.org

Ngày gửi bài: 01.08.2018

Ngày chấp nhận: 26.08.2018

TÓM TẮT

Sự liên lạc giữa tế bào vi khuẩn với tế bào vi khuẩn (quorum sensing - QS) có liên quan đến gen độc lực của vi khuẩn gây bệnh. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá QS giữa *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease-AHPND) với *Vibrio alginolyticus* không gây bệnh AHPND, đồng thời xác định vai trò của tinh dầu quế đối với QS giữa *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*. Phương pháp sử dụng bao gồm nuôi cấy truyền thống và kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy *V. alginolyticus* đã tiếp nhận gen độc gây bệnh AHPND từ *V. parahaemolyticus* trong điều kiện nuôi có sốc nhiệt 3 lần ở 40°C (5 phút) và 70°C (2 phút) thông qua cơ chế QS. Ngoài ra, tinh dầu quế sử dụng với liều 0,1 µL/600 µL đã làm rối loạn hệ thống giao tiếp đặc hiệu QS của vi khuẩn làm *V. alginolyticus* không tiếp nhận được thông tin của gen độc gây bệnh AHPND ở tôm nước lợ từ *V. parahaemolyticus*.

Từ khóa: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, Quorum sensing, tinh dầu quế, AHPND.

Evaluation of Quorum Sensing Communication between Pathogenic Bacteria Causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease and Vibrio Alginolyticus

ABSTRACT

Bacterial cell-to-cell communication (quorum sensing - QS) is associated with the virulence of pathogenic bacteria. The study was conducted to evaluate the QS communication between *Vibrio parahaemolyticus* - pathogenic agent causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and *V. alginolyticus*- non-AHPND and, concurrently, to determine the role of cinnamon essential oil for QS between two bacterial species mentioned above. The methods used included traditional bacterial culture and PCR technique. Results showed that *V. alginolyticus* received virulence gene AHPND from *V. parahaemolyticus* under the culture condition with three times of heat shock at 40°C (5 min) and 70°C (2 min) via QS mechanism. In addition, cinnamon essential oil with a dose of 0.1µL/600µL disrupted the QS communication system of bacteria, causing *V. alginolyticus* impossible to receive virulence gene causing AHPND from *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, Quorum sensing, cinnamon essential oil, AHPND

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quorum sensing (QS) là một dạng “ngôn ngữ giao tiếp của vi khuẩn”, chúng có thể liên lạc và trao đổi thông tin để cộng tác thông qua các vật chất mang tín hiệu (Schauder & Bassler, 2001). Hầu hết các vi khuẩn gây bệnh với hệ QS đã được nghiên cứu đều cho thấy rằng QS có

liên quan đến gen gây bệnh hay tính độc lực của vi khuẩn gây bệnh (Coutteau & Goossens, 2013; Defoirdt & Sorgeloos, 2012). Kết quả của cơ chế tác động QS là lan truyền phân tử tín hiệu/gen mã hóa độc lực cho vi khuẩn liên kề, từ đó gia tăng mật độ vi khuẩn có chứa gen độc lực đủ lớn để gây hại cho vật chủ, đồng thời các chủng vi khuẩn sau khi tiếp nhận được tín hiệu gen mã

hóa độc lực sẽ trải qua quá trình sinh sản để gia tăng về số lượng (Waters & Bassler, 2005).

Nghiên cứu giải pháp làm rối loạn cơ chế QS của vi khuẩn gây bệnh, khiến cho phân tử tín hiệu mã hóa gen độc lực không được lan truyền cho vi khuẩn liên kế là hướng nghiên cứu hiện nay đang được quan tâm, giúp kiểm soát mật độ vi khuẩn mang gen độc lực gây bệnh cũng như việc hạn chế vật nuôi nhiễm bệnh. Một số hoạt chất được xác định có hiệu quả như halogen furanons được chiết xuất từ tảo đỏ (một loài tảo biển), dịch chiết xuất thô từ cây chó đẻ răng cưa (*Phyllanthus amarus*) (Priya *et al.*, 2013), vỏ cây quế (*Cinnamomum verum*) (Yap *et al.*, 2015) đã được chứng minh có khả năng ức chế QS, gây rối loạn thông tin làm giảm quá trình truyền và tiếp nhận thông tin của gen độc lực ở vi khuẩn gây bệnh, qua đó bảo vệ cá tôm không bị nhiễm tác nhân gây bệnh (Defoirdt, 2007; Rasch *et al.*, 2004).

Bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease-AHPND) xuất hiện lần đầu tiên tại Trung Quốc năm 2009, tiếp đến được ghi nhận tại Thái Lan năm 2010, Việt Nam năm 2011, Malaysia năm 2012 (FAO, 2013), Mexico năm 2013 (Schryver *et al.*, 2014) và gần đây nhất là ở Mỹ La tinh năm 2017 (Han, 2017). Tác nhân gây bệnh AHPND được xác định là *V. parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013), *V. harveyi* (Kondo *et al.*, 2015) và *V. campbellii* (Han, 2017). Ba chủng vi khuẩn này đều chứa gen pirAB_{vp}- một loại gen độc gây AHPND ở tôm. Điều đó cũng chỉ ra, gen sinh độc tố gây AHPND có thể lan truyền theo chiều ngang giữa các loài vi khuẩn (từ *V. parahaemolyticus* sang *V. harveyi*, *V. campbellii*) trong các ao nuôi tôm thông qua cơ chế QS của loài vi khuẩn gây bệnh. Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định điều kiện xảy ra cơ chế QS ở vi khuẩn gây AHPND ở tôm nuôi nước lợ, đồng thời xác định vai trò của dịch chiết từ vỏ quế ảnh hưởng đến rối loạn truyền thông tin QS của vi khuẩn gây AHPND. Trong môi trường ao nuôi tôm nước lợ thường xuyên có mặt các chủng thuộc *Vibrio*, trong nghiên cứu này

chúng tôi lựa chọn *V. alginolyticus* bởi lẽ *V. alginolyticus* và *V. parahaemolyticus* là hai chủng vi khuẩn khi phát triển trên TCBS lần lượt có khuẩn lạc màu vàng và xanh. Sự khác biệt về màu sắc giúp nghiên cứu dễ dàng phân biệt tách được 2 chủng *V. alginolyticus* và *V. parahaemolyticus* sau khi nuôi chung trong cùng môi trường.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND được lưu giữ tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA), Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I. Vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* trong nước lợ nuôi tôm.

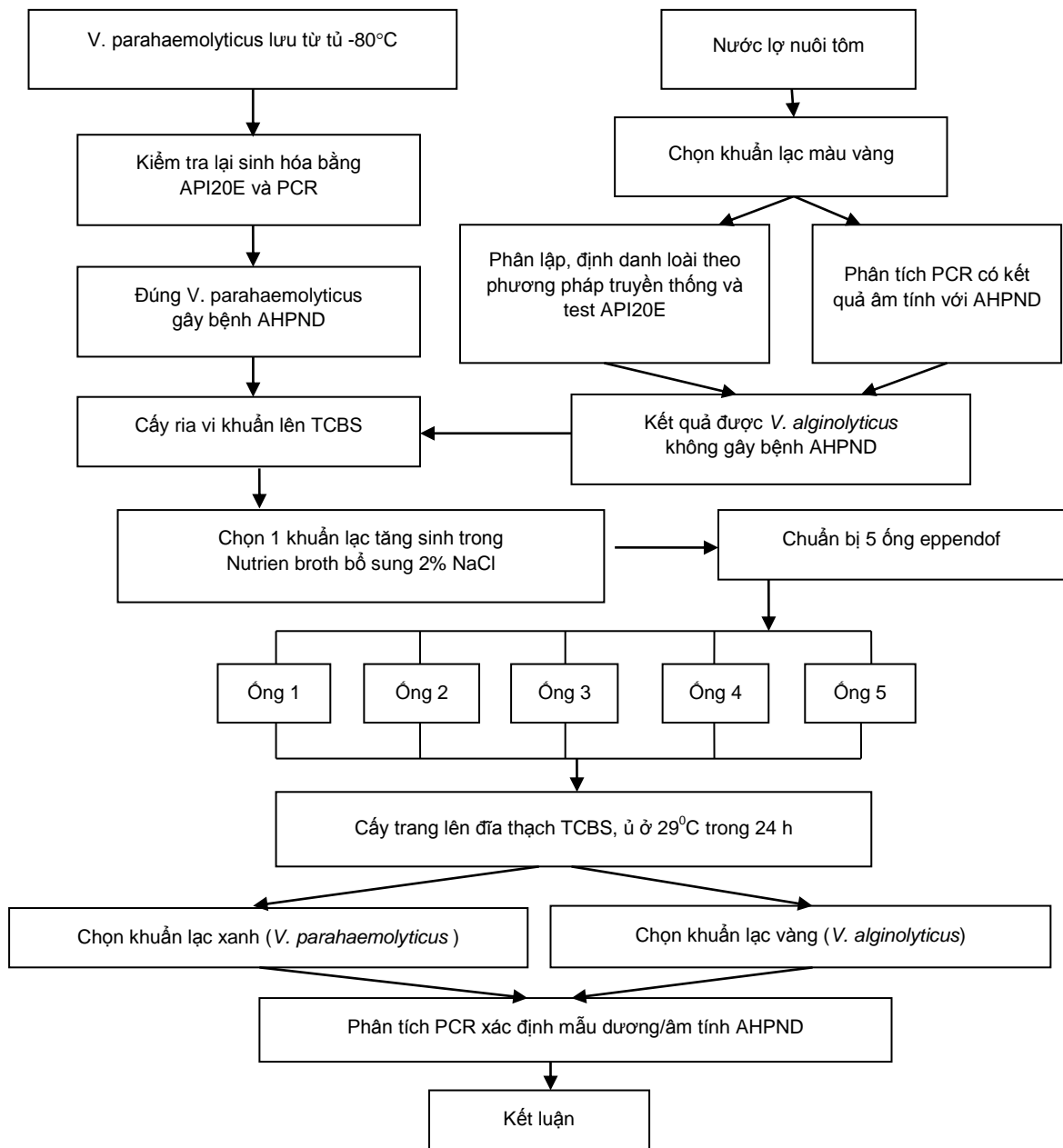
Môi trường tối ưu của vi khuẩn *Vibrio* sp. là Thiosulfate Citrate Bile Salts (TCBS), đun sôi để nguội đến 40-50°C rồi đổ ra đĩa peptri để sử dụng nuôi cấy vi khuẩn. Môi trường nuôi cấy cơ bản Nutrient Broth (NB) có bổ sung 2% NaCl, được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút rồi để nguội dùng nuôi tăng sinh vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*.

Sản phẩm tinh dầu quế được chiết xuất từ cây quế (*Cinnamomum* sp).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các bước thực hiện nghiên cứu được mô tả bằng hình 1.

Trong 5 ống eppendorf (1, 2, 3, 4 và 5): chứa 300 μ L *V. parahaemolyticus* và 300 μ L *V. alginolyticus*. Ống 1 hỗn hợp vi khuẩn được cho vào 100 mL Nutrient broth có bổ sung 2% NaCl (NB 2% NaCl) nuôi lắc 200 vòng/phút trong 29°C sau 15 giờ trang vi khuẩn lên đĩa thạch TCBS. Ống 2, 3, hỗn dịch được sốc nhiệt lần lượt 40°C trong 5 phút, 3 lần và 70°C trong 2 phút 3 lần. Ống 4, 5 được thực hiện tương tự ống 3,4 tuy nhiên có bổ sung 0,1 μ L tinh dầu quế trước khi sốc nhiệt. Ống 2, 3, 4 và 5 tiếp tục nuôi ở 29°C trong 3 h trước khi trang trên đĩa thạch TCBS.



Hình 1. Các bước thực hiện nghiên cứu

Phân tích vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR: sử dụng cặp môi AP3 (F: ATGAGTAACAATAAAACATGAAAC; R: GTGGTAATATTGTACAGAA) được công bố bởi Sirikharin *et al.* (2014). Cặp môi AP3 đã khuếch đại đoạn gen 336 bp của gen Toxin gây hoại tử gan tụy cấp ở tôm, chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR được áp dụng như sau: 95°C (5 phút), [35 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 40 giây)], 72°C (5 phút) và 4°C

(∞). Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1% trong dung dịch 1X TAE và đọc kết quả dưới đèn UV.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Quorum sensing giữa vi khuẩn gây AHPND và vi khuẩn không gây AHPND

Trong nghiên cứu này vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có khuẩn lạc màu xanh khi

Đánh giá khả năng giao tiếp (Quorum sensing) giữa vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp với *Vibrio alginolyticus*



Ký hiệu	O N P G	A D H	L D C	O D C	C I T	H 2 S	U R E	T D A	I N D	V P	G E L	G L U	M A N	I N O	S O R	R H A	S A C	M E L	A M Y	A R A	Tên loài
CED13	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>V.parahaemolyticus</i>
CED18	-	-	+	-	w	-	-	-	+	w	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	<i>V.alginolyticus</i>

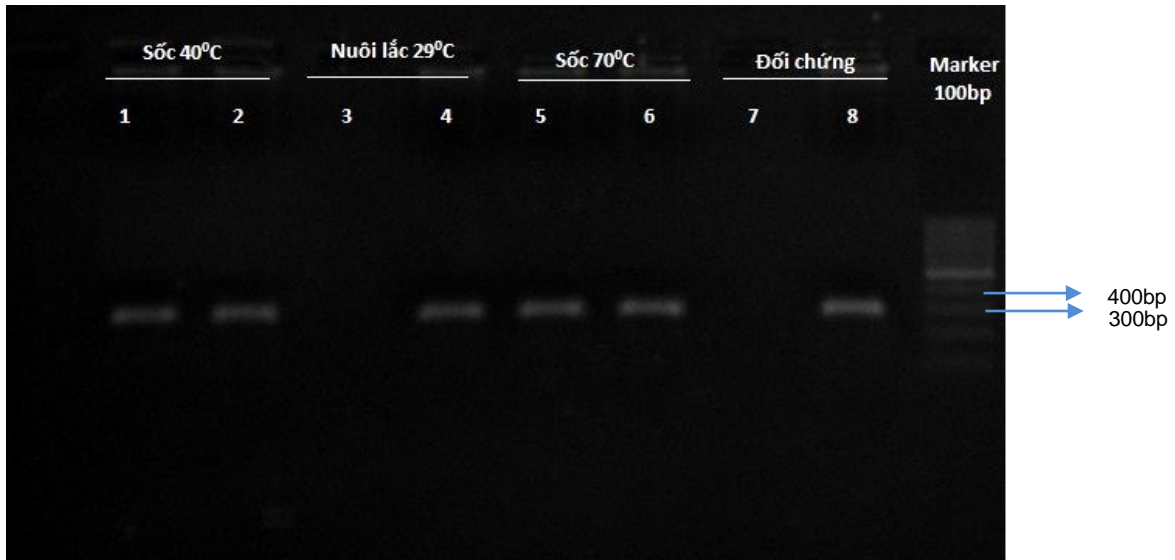
Ghi chú: A: Đặc điểm sinh hóa của *V. parahaemolyticus* và *V. Alginolyticus*; B: xác định chủng vi khuẩn gây AHPND bằng kỹ thuật PCR.

Hình 2. Đặc tính của vi khuẩn

phát triển trên môi trường thạch TCBS, màu xanh do vi khuẩn không có khả năng lên men đường saccarose và rõ ràng phản ứng đường ở ống mang mã SAC có màu xanh (Hình 1A). *V. alginolyticus* có khuẩn lạc màu vàng trên TCBS do vi khuẩn đã lên men đường saccarose tạo ra màu vàng ở ống tuýp mang mã SAC ở test API20E (Hình 2A). Kết quả phân tích bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi AP3 (khuếch đại gen toxin gây hoại tử gan tụy cấp ở tôm) đã chỉ ra *V. parahaemolyticus* là tác nhân gây AHPND và *V. alginolyticus* không phải là tác nhân gây bệnh AHPND (Hình 2B).

Nuôi tăng sinh chung trong môi trường lỏng 2 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* ở điều kiện 29°C, lắc 200 vòng/phút, sau 15 h định lượng lấy riêng lẻ khuẩn lạc xanh và vàng phân tích PCR với cặp mồi AP3. Kết quả cho thấy khuẩn lạc xanh (*V. parahaemolyticus*) xuất hiện vạch có kích thước 336 bp trùng khớp với đối chứng dương trong khi đó khuẩn lạc vàng (*V. alginolyticus*) không có vạch nào xuất hiện trên bản gel tương ứng với đối chứng âm, điều đó chứng tỏ *V. alginolyticus* không nhận được tín hiệu phân tử

gây bệnh AHPND từ *V. parahaemolyticus* (Hình 3). Bên cạnh đó, khi hỗn hợp 2 chủng vi khuẩn được sốc nhiệt 3 lần ở 40°C và 70°C lần lượt tương ứng 5 phút và 2 phút thì kết quả cho thấy cả 2 chủng *V. alginolyticus* và *V. parahaemolyticus* đều xuất hiện vạch dương tính trên bản gel với kích thước 336 bp (Hình 3). Như vậy, rõ ràng *V. alginolyticus* đã nhận phân tử tín hiệu gen sinh toxin gây AHPND ở tôm nuôi nước lợ từ *V. parahaemolyticus* trong điều kiện sốc nhiệt độ 40°C và 70°C. Điều kiện môi trường có vai trò quan trọng ảnh hưởng đến quá trình phát và nhận thông tin (QS) của vi khuẩn gây bệnh đã được một số nghiên cứu chứng minh và chỉ ra, ở mỗi một loài, chủng vi khuẩn gây bệnh khác nhau chịu tác động của điều kiện môi trường khác nhau. Cơ chế QS phát và nhận thông tin của *V. vulnificus* chịu ảnh hưởng của hàm lượng glucose, dinh dưỡng (McDougald *et al.*, 2006) và nhiệt độ, sự có mặt của oxy (Hilton *et al.*, 2006). Đối với *V. cholerae* cơ chế QS xảy ra khi mật độ vi khuẩn đủ lớn, vì vậy QS phụ thuộc vào mật độ của chính vi khuẩn đó trong môi trường (Kamruzzaman *et al.*, 2010).



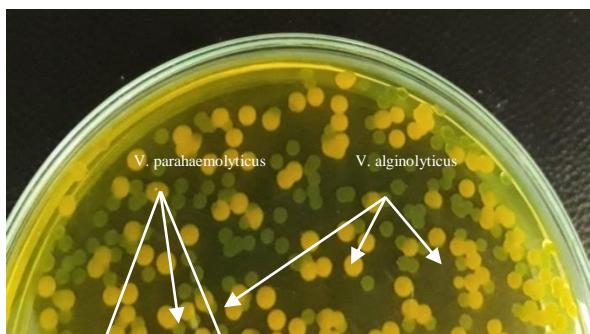
Ghi chú: 1, 3 và 5: *V. alginolyticus*; 2,4 và 6: *V. parahaemolyticus*, 7 đối chứng âm, 8: đối chứng dương.

Hình 3. AHPND xác định trong điều kiện nuôi lác và sốc nhiệt

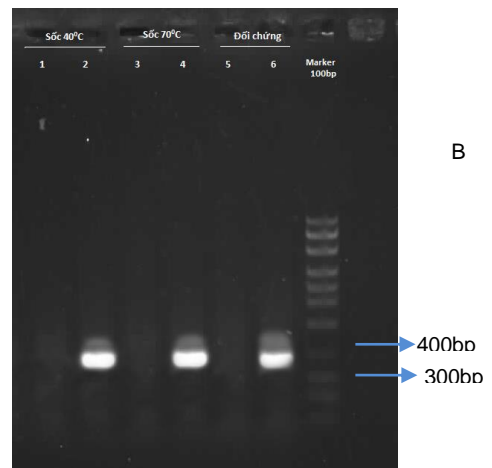
3.2. Ảnh hưởng của tinh dầu quế đến quá trình quorum sensing của vi khuẩn

Từ kết quả nghiên cứu ở nội dung nêu trên, xác định được ở điều kiện 29°C lác 200 vòng/phút, sau 15 h *V. alginolyticus* không nhận

được tín hiệu gen toxin gây AHPND từ *V. parahaemolyticus*. Vì vậy, ở nội dung này nghiên cứu tập trung ở thí nghiệm nhiệt độ 40°C (5 phút) và 70°C (2 phút). Với môi trường nuôi cấy vi khuẩn có bổ sung tinh dầu quế (0,1



A



B

1 và 3: *V. alginolyticus*;
2 và 4: *V. parahaemolyticus*, 5 đối chứng âm,
6 đối chứng dương

Ghi chú: A: Khuẩn lác mọc sau sốc nhiệt và có bổ sung tinh dầu quế, B: khuẩn lác thu phân tích AHPND

Hình 4. Vi khuẩn sốc nhiệt và có bổ sung tinh dầu quế vào môi trường nuôi cấy

$\mu\text{L}/150 \mu\text{L}$), kết quả phân tích PCR với cặp mồi AP3 cho thấy *V. parahaemolyticus* xuất hiện vạch dương tính có kích thước 336 bp và *V. alginolyticus* không xuất hiện vạch ở bản gel (Hình 4B). Điều đó chứng tỏ tinh dầu quế đã có ảnh hưởng tới hệ thống giao tiếp đặc hiệu QS của vi khuẩn làm *V. alginolyticus*, làm chúng không tiếp nhận được thông tin của gen pirAB_{vp} gây bệnh AHPND ở tôm nước lợ từ *V. parahaemolyticus*. Kết quả nghiên cứu bước đầu trùng hợp với nghiên cứu của Aparna *et al.* (2014) khi chỉ ra tinh dầu vỏ quế có hiệu quả ức chế quá trình QS của vi khuẩn *Serratia* và diệt khuẩn *Pseudomonas* (Aparna *et al.*, 2014). Kết quả có giá trị thực tiễn, là hướng gợi mở cho nghiên cứu tiếp về việc tạo sản phẩm có nguồn gốc thảo dược là quế có hiệu quả phòng bệnh AHPND ở tôm.

Một số nghiên cứu chỉ ra sản phẩm tách chiết từ thảo dược có chứa các hợp chất chống QS thông qua việc ngăn chặn tạo tín hiệu hoặc truyền tin QS của vi khuẩn gây bệnh. Methanolic từ cây chó đẻ răng cưa (*Phyllanthus amarus*) ở Trung Quốc khi sử dụng gia tăng nồng độ sẽ có hiệu quả làm giảm khả năng lan truyền, sản xuất pyocyanin, một biểu hiện độc lực của vi khuẩn (Priya *et al.*, 2013). Ngoài ra, hoạt chất chiết xuất từ cây phục linh (*Poria cum Radix pini/Poris cocos*), bạch chỉ (*Angelica dahurica*), củ ly (*Rhizoma cibotii*) và kinh giới (*Schizonepeta tenuifolia*) được chiết xuất bằng hexan, chloroform và methanol đều làm giảm lan truyền và sản xuất pyocyanin của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Chong *et al.*, 2018).

4. KẾT LUẬN

V. alginolyticus đã tiếp nhận gen toxin gây bệnh AHPND từ *V. parahaemolyticus* trong điều kiện nuôi cấy có sốc nhiệt 3 lần ở 40°C (5 phút) và 70°C (2 phút) thông qua cơ chế QS (quorum sensing-giao tiếp của vi khuẩn).

Tinh dầu vỏ quế sử dụng với liều 0,1 $\mu\text{L}/600 \mu\text{L}$ đã làm rối loạn hệ thống giao tiếp đặc hiệu QS của vi khuẩn làm cho *V. alginolyticus* không

tiếp nhận được thông tin của gen toxin gây bệnh AHPND ở tôm nước lợ từ *V. parahaemolyticus*.

5. ĐỀ XUẤT

Kiểm tra sự truyền gen toxin gây AHPND từ *V. parahaemolyticus* sang vi khuẩn *V. alginolyticus* ở điều kiện mật độ vi khuẩn cao.

Xác định liều sử dụng tối thiểu tinh dầu quế có hiệu quả ức chế QS của vi khuẩn gây bệnh AHPND.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aparna Y., Narayanan L., Sarada J. (2014). Quorum quenching ability of dietary spice *Cinnamomum verum* on pathogenic bacteria. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 5: 5216-5223. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.5(12).5216-23
- Chong Y.M., Yan K., Yin W.F., Chan K.G. (2018). The Effects of Chinese Herbal Medicines on the Quorum Sensing-Regulated Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecules*, 23: 1-14.
- Coutteau P., Goossens, T. (2013). Functional Feeds as effective strategies against EMS. *Aquac. Asia Pacific*, 9: p. 31.
- Defoirdt, T. (2007). Quorum sensing disruption and the use of short-chain fatty acids and polyhydroxyalkanoates to control luminescent vibriosis (Doctoral dissertation, Ghent University).
- Defoirdt T., Sorgeloos, P. (2012). Monitoring of *Vibrio harveyi* quorum sensing activity in real time during infection of brine shrimp larvae. *ISME J.*, 6: 2314-2319. doi:10.1038/ismej.2012.58
- Han J.E. (2017). Four AHPND strains identified on Latin American shrimp farms. <http://advocate.gaalliance.org/four-ahpnd-strains-identified-on-latin-american-shrimp-farms/>.
- Hilton, T., Rosche, T., Froelich, B., Smith, B., Oliver, J. (2006). Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 6986-6993. doi:10.1128/AEM.00544-06
- Kamruzzaman M., Udden S.M.N., Cameron D.E., Calderwood S.B., Nair G.B., Mekalanos J.J., Faruque S.M. (2010). Quorum-regulated biofilms enhance the development of conditionally viable, environmental *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107: 1588-1593. doi:10.1073/pnas.0913404107
- Kondo H., Van P.T., Dang L.T., Hirono I. (2015). Draft Genome Sequence of Non-*Vibrio* *parahaemolyticus* Acute Hepatopancreatic

- Necrosis Disease Strain KC13.17.5, Isolated from Diseased Shrimp in Vietnam. *Genome Announc* 3. doi:10.1128/genomeA.00978-15
- McDougald D., Lin W., Rice S., Kjelleberg S. (2006). The role of quorum sensing and the effect of environmental conditions on biofilm formation by strains of *Vibrio vulnificus*. *Biofouling*, 22: 133-144. doi:10.1080/08927010600743431
- Priya K., Yin W.F., Chan K.G. (2013). Anti-quorum sensing activity of the traditional chinese herb, *Phyllanthus amarus*. *Sensors (Switzerland)*, 13: 14558-14569. doi:10.3390/s131114558
- Rasch M., Buch C., Austin B., Slierendrecht W.J., Ekmann K., Larsen J.C.J., Riedel K. Eberl, L., Givskov, M., Gram, L. (2004). An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by Vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 350-359.
- Schauder S., Bassler B.L. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.899601
- Waters, C.M., Bassler, B.L. (2005). Quorum Sensing : Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 319-346. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
- Yap P.S.X., Krishnan T., Chan K.G., Lim S.H.E. (2015). Antibacterial mode of action of *Cinnamomum verum* bark essential oil, alone and in combination with piperacillin, against a multi-drug-resistant *Escherichia coli* strain. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 1299-1306. doi:10.4014/jmb.1407.07054.