



ẢNH HƯỞNG CỦA SÓNG SIÊU ÂM TẦN SỐ THẤP (20 kHz) LÊN MẬT ĐỘ VÀ ĐỘ LỰC CỦA VI KHUẨN *Vibrio* *alginolyticus* GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ HỒNG MỸ (*Sciaenops ocellatus*)

Nguyễn Thị Xuân Hồng^{1,*}, Nguyễn Ngọc Bảo Lâm², Ngô Đức Phát²,
Hoàng Phạm Minh Khánh², Phạm Trung Nghĩa³, Chu Đình Tuyển²,
Nguyễn Đức Quỳnh Anh¹, Nguyễn Nam Quang¹, Nguyễn Thị Huế Linh¹

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

² Trường phổ thông liên cấp Newton, Khu đô thị Goldmark City 136 Hồ Tùng Mậu, Phú Diễn,
Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

³ Trường Chuyên Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 182 Lương Thế Vinh, Thanh Xuân
Bắc, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Xuân Hồng <ntx.hong@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 30-11-2024; Ngày chấp nhận đăng: 17-12-2024)

Tóm tắt. Bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* đang là thách thức lớn nhất cho nghề nuôi cá biển nói chung và cá Hồng mỹ nuôi lồng bè thâm canh. Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên độc lực của vi khuẩn *V. alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ. Kết quả thí nghiệm cho thấy, huyền phù vi khuẩn *V. alginolyticus* đã được xử lý bởi sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) trong 10, 20 và 30 phút đã làm giảm mật độ vi khuẩn và giảm khả năng hoạt động các enzyme lipase, phospholipase, caseinase, và haemolysin. Thí nghiệm cảm nhiễm cá Hồng mỹ với vi khuẩn *V. alginolyticus* đã được xử lý bởi sóng siêu âm trong 10 hoặc 20 phút đã làm giảm tỷ lệ chết của cá Hồng mỹ thí nghiệm so với nghiệm thức đối chứng.

Từ khoá: bệnh xuất huyết, hoạt tính enzyme, màng sinh học biofilm, *Vibrio*

Effect Of Low Frequency Ultrasound (20 Khz) On The Density And Virulence Of *Vibrio Alginolyticus* Causing Haemohagic Disease In Red Drum (*Sciaenops Ocellatus*)

Nguyen Thi Xuan Hong^{1*}, Nguyen Ngoc Bao Lam², Ngo Duc Phat²,
Hoang Pham Minh Khanh², Pham Trung Nghia³, Chu Dinh Tuyen²,
Nguyen Duc Quynh Anh¹, Nguyen Nam Quang¹, Nguyen Thị Hue Linh¹

¹ University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

² Newton Grammar School, Goldmark City 136 Ho Tung Mau St., Phu Dien, Bac Tu Liem, Hanoi, Vietnam

³ High School for Gifted Students, Hanoi National University, 182 Luong The Vinh St., Thanh Xuan Bac, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Xuan Hong <ntx.hong@hueuni.edu.vn>

(Submitted: November 30, 2024; Accepted: December 17, 2024)

Abstract. Haemorrhagic disease caused by *Vibrio alginolyticus* is one of the major challenges in marine fish farming, particularly in the intensive cage farming of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aim of this study was to evaluate the impact of low-frequency ultrasound (20 kHz) on the virulence of *V. alginolyticus* in the context of haemorrhagic disease in red drum. Experimental results showed that exposure to low-frequency ultrasound in bacterial suspensions for 10, 20, and 30 minutes reduced bacterial density and decreased the activity of several enzymes, including lipase, phospholipase, caseinase, and haemolysin. Furthermore, experimental infection of red drum with *V. alginolyticus* treated with low-frequency ultrasound for 10, or 20 minutes resulted in a lower mortality rate compared to the control group, where bacteria were not treated with ultrasound.

Keywords: biofilm formation, enzyme activity, haemorrhagic disease, *Vibrio*

1 Đặt vấn đề

Sóng siêu âm là một dạng năng lượng dao động được tạo ra bởi bộ chuyển đổi (transducer) chuyển đổi năng lượng điện thành năng lượng sóng âm. Đây là một dạng sóng có tần số vượt quá ngưỡng nghe của con người [1]. Dựa trên tần số, sóng siêu âm có thể được phân loại như sau: sóng siêu âm tần số thấp (20–100 kHz), sóng siêu âm tần số cao (100 kHz–1 MHz), và sóng siêu âm chẩn đoán (1–500 MHz) [2]. Sóng siêu âm tần số thấp tạo ra các lực cắt và cơ học mạnh mẽ và được sử dụng rộng rãi trong các quá trình nhũ hóa trong ngành công nghiệp sữa. Ngược lại, sóng siêu âm tần số cao được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng yêu cầu một lượng lớn các gốc tự do redox, chẳng hạn như quá trình oxy hóa các chất ô nhiễm hữu cơ trong môi trường nước. Đặc biệt, sóng siêu âm tần số cao được sử dụng cho các mục đích giám sát chất lượng thực phẩm và chẩn đoán [3]. Khi sóng siêu âm lan truyền trong một chất lỏng, hiện tượng xuất hiện các bọt khí trong chất lỏng (cavitation) sẽ được tạo ra do sự thay đổi áp suất [4, 5]. Dưới tác dụng

của sóng siêu âm, các bọt khí dao động, phát triển và sụp đổ không đối xứng, tạo ra các tia vi mô [6, 7]. Sự bùng nổ tạo ra các cú sốc áp suất lên tới hàng nghìn atm, sóng sốc mạnh với các tia vi mô có tốc độ lên đến 400 km/h, và tạo ra các điểm nóng có nhiệt độ lên tới 5000 K với các tác động cơ học chiếm ưu thế hơn các tác động hóa học [8, 9]. Trong môi trường phản ứng, ba pha khác nhau đã được xác định: trong pha đầu tiên, các phản ứng phân hủy nhiệt (pyrolysis) xảy ra. Trong pha thứ hai và thứ ba, các gốc tự do có thể xuất hiện, thường gặp nhất là sự hình thành gốc hydroxide (OH \cdot). Gốc này có tính phản ứng rất cao và tấn công các cơ chất hữu cơ hoặc kết hợp với một gốc OH \cdot khác để tạo thành H $_2$ O $_2$ và đây là cơ sở cho việc ứng dụng sóng siêu âm trong diệt khuẩn [9, 10]. Vi khuẩn *E. aerogenes* hay *Klebsiella aerogenes* bị vô hiệu hoá ở sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz), trong khi đó siêu âm tần số cao (850 kHz) không làm bất hoạt vi khuẩn này ngay cả khi sử dụng công suất lên đến 50 W trong 60 phút [11]. Cameron và cs. [12], đã xác định khả năng của sóng siêu âm trong việc loại bỏ vi khuẩn cụ thể số lượng vi khuẩn *Escherichia coli*, hay *Pseudomonas fluorescens* giảm 100% sau 10 phút xử lý bằng sóng siêu âm.

Cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) là một trong những đối tượng cá biển được nuôi phổ biến và là 1 trong 5 loài cá nằm trong chiến lược phát triển nuôi trồng trên biển đến năm 2030 và tầm nhìn đến năm 2045 của Việt Nam (Quyết định số 1664/QĐ-TTg ngày 4/10/2021 của Thủ tướng Chính phủ). Dịch bệnh, đặc biệt là bệnh xuất huyết, lở loét do vi khuẩn *V. alginolyticus* được xem là tác nhân chính gây ra bệnh xuất huyết lở loét trên đối tượng này [13, 14]. Vi khuẩn *V. alginolyticus* không những gây bệnh trên cá biển mà còn gây bệnh trên giáp xác, nhuyễn thể và gây bệnh trên cả con người [15, 16], do đó đã có nhiều kháng sinh và hoá chất được sử dụng để kiểm soát dịch bệnh do vi khuẩn này gây ra nhưng lại gây ra nhiều tác hại cho môi trường [17], [18]. Chính vì vậy nghiên cứu các giải pháp an toàn như sử dụng sóng siêu âm hay cực tím trong kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn này trong nuôi trồng thủy sản nhằm thay thế kháng sinh và hoá chất là vấn đề cấp thiết hiện nay. Sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) được ứng dụng nhiều để xử lý nhiễm khuẩn trong thực phẩm [9–12], nhưng chưa có nghiên cứu nào trước đây sử dụng sóng siêu âm trong quản lý vi khuẩn gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Nghiên cứu này thực hiện nhằm mục đích ứng dụng sóng siêu âm tần số thấp trong việc kiểm soát mật độ và độc lực của vi khuẩn *V. alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ tại Việt Nam.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* phân lập từ mẫu bệnh cá Hồng mỹ (*S. ocellatus*) bị bệnh xuất huyết tại tỉnh Thừa Thiên Huế [13] được bảo quản trong dung dịch glycerol 20% ở nhiệt độ -80 °C. Vi khuẩn từ dung dịch bảo quản glycerol trước tiên được nuôi trên môi trường Tryptic soy agar (TSA, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2% muối (TSA+2% NaCl) ở 28 °C trong 24 giờ, sau đó khuẩn lạc thuần được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường Tryptic soy broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2% muối (TSB+2% NaCl) ở 28 °C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ.



Hình 1. Vi khuẩn *V. alginolyticus* được xử lý siêu âm tần số thấp (20 kHz)

Mật độ vi khuẩn được xác định theo phương pháp đo mật độ quang học (Optical density - OD) bằng máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản) ở bước sóng 600 nm, với giá trị OD = 1 tương đương mật độ vi khuẩn là 10^8 CFU/mL [14]. Dung dịch vi khuẩn sau đó được xử lý với sóng siêu âm ở bồn siêu âm (Ultrasonic cleaner, Trung Quốc) ở tần số 20 kHz trong 10 phút (thí nghiệm NT1), 20 phút (NT2) và 30 phút (NT3). Nghiệm thức đối chứng là huyền phù vi khuẩn không xử lý sóng siêu âm (Hình 1).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20kHz) lên mật độ vi khuẩn *V. alginolyticus*

Dung dịch huyền phù vi khuẩn ở giá trị OD = 1 không xử lý sóng siêu âm (ĐC) hoặc đã được xử lý sóng siêu âm trong 10 phút (NT1), 20 phút (NT2) hoặc 30 phút (NT3) được pha loãng từ nồng độ 10^{-2} đến 10^{-4} . Lấy 100 μ L ở mỗi nồng độ pha loãng khác nhau của các nghiệm thức thí nghiệm nhỏ lên đĩa TSA + 2% NaCl và cấy đều trên đĩa thạch bằng que cấy tam giác vô trùng. Mỗi nồng độ pha loãng của mỗi nghiệm thức lặp lại 6 lần. Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ 28 °C trong 24 giờ. Sau đó, xác định mật độ vi khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc của Miles và cs [19].

Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên khả năng di động của vi khuẩn *V. alginolyticus*

Khả năng di động của vi khuẩn được thực hiện trong môi trường thạch mềm TSA+2% NaCl (chứa 0,3% agar). Nhỏ 10 μ L dung dịch huyền phù vi khuẩn (OD₆₀₀ = 0,5) đã được xử lý hoặc không xử lý qua bồn siêu âm lên đĩa thạch mềm và ủ tại nhiệt độ 28 °C. Đường kính vòng di động xung quanh khuẩn lạc được đo sau khi ủ 24h. Thí nghiệm được bố trí với 6 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức nghiên cứu.

Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) đến hoạt tính của một số enzyme do *V. alginolyticus* sản sinh (lipase, phospholipase, caseinase và haemolysin)

Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên hoạt tính enzyme của *V. alginolyticus* được thực hiện theo hướng dẫn của Yang và cs. [20]. Môi trường TSA+2% NaCl sau khi hấp tiệt trùng (121 °C, 15 phút) được làm nguội xuống nhiệt độ 55 °C và bổ sung các cơ chất khác nhau để xác định các hoạt tính enzyme khác nhau. Hoạt tính thủy phân của enzyme lipase được thực hiện bằng cách nhỏ 5µL huyền phù vi khuẩn (OD = 0,5) có hoặc không xử lý bằng sóng siêu âm trên đĩa thạch TSA+2% NaCl có bổ sung 1% Tween 80 (Sigma – Aldrich). Tất cả đĩa thạch được ủ tại 28 °C, xác định đường kính khuẩn lạc và vòng thủy phân sau 48 h. Hoạt tính của enzyme caseinase, phospholipase, và haemolysin được thực hiện tương tự, bằng cách bằng cách nhỏ 5µL huyền phù vi khuẩn (OD = 0,5) trên đĩa thạch TSA+2% NaCl có bổ sung 1% nhũ tương lòng đỏ trứng (egg yolk emulsion) (Sigma-Aldrich) để xác định hoạt tính caseinase, hoặc 4% bột sữa tách béo (Woolworths, Úc) cho việc xác định hoạt tính phospholipase, hoặc 5% máu cừu cho hoạt tính haemolysin. Thí nghiệm được bố trí với sáu lần lặp lại cho mỗi hoạt tính enzyme và thời gian xử lý sóng siêu âm.

Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên khả năng gây bệnh của vi khuẩn *V. alginolyticus* lên cá Hồng mỹ

Cá thí nghiệm: Cá Hồng mỹ có khối lượng 5–5,5 g/con, kích cỡ đồng đều, màu sắc tươi sáng được mua tại Công ty TNHH MTV Thương mại Thủy sản Quốc Thắng (Thừa Thiên Huế), được kiểm dịch không mang mầm bệnh *Vibrio* tại Trạm xá Thú y, Chi cục Chăn nuôi và Thú y Thừa Thiên Huế. Thí nghiệm được bố trí trong bể composite 1m³, độ mặn 25‰, cho ăn hàng ngày (5% khối lượng thân) bằng thức ăn dành riêng cho cá biển của Công ty Cổ phần chăn nuôi CP (Việt Nam), mã số 9931, có hàm lượng protein thô ≥ 45%, sục khí liên tục 24 giờ/ngày. Cá được nuôi tại phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Trước khi tiến hành thí nghiệm, năm con cá được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra vi khuẩn bằng cách lấy mẫu thận cá cấy trực tiếp trên môi trường TSA+2% NaCl và môi trường TCBS ủ ở nhiệt độ 28 °C trong 24 giờ.

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi tăng sinh 24 giờ ở 28 °C trong môi trường TSB+2% NaCl, sau đó dung dịch huyền phù vi khuẩn được ly tâm và rửa 2 lần bằng dung dịch NaCl 0,85%. Vi khuẩn sau đó được xử lý với sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) trong 0, 10 hoặc 20 phút. Sau đó, dung dịch vi khuẩn được xác định mật độ vi khuẩn là 10⁶ CFU/mL là liều lượng gây chết 60% - LD₆₀ là 10⁶ CFU/mL (đã được xác định, số liệu không công bố) bằng phương pháp đếm khuẩn lạc của Miles và cs. [19]. Cá được cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm trong môi trường nước có chứa vi khuẩn (có hoặc không xử lý sóng siêu âm trong thời gian 10 và 20 phút) và nghiệm thức đối chứng âm (không bổ sung vi khuẩn mà thay bằng dung dịch nước muối sinh lý 0,85% NaCl vô trùng) trong 30 phút. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức. Cá sau khi cảm nhiễm được nuôi trong hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/phút, nhiệt độ 28–30 °C. Cá được

cho ăn hằng ngày với khối lượng tương đương 2% trọng lượng thân bằng thức ăn mã số 9931 và chế độ sục khí liên tục 24 giờ/ngày. Cá được theo dõi hàng ngày và tỷ lệ chết tích lũy của cá được xác định sau 14 ngày thí nghiệm.

2.3 Xử lý số liệu

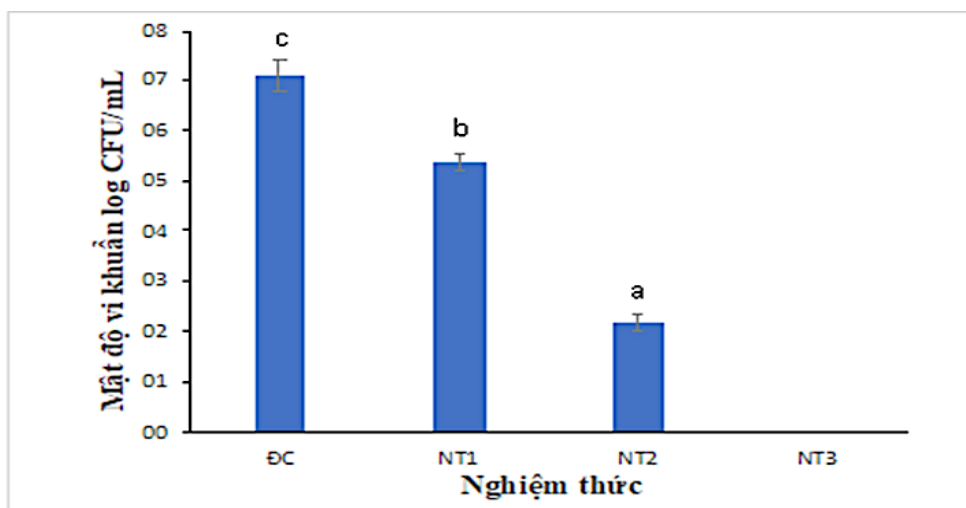
Số liệu được thu thập và so sánh bằng phần mềm SPSS (IBM SPSS 23.0). Phân bố chuẩn và sự đồng nhất phương sai được xem xét bằng test Shapiro-Wilk và Levene's test trước khi so sánh ANOVA. Tất cả số liệu được so sánh giá trị trung bình bằng ANOVA với phép thử Tukey post hoc test hoặc so sánh nhiều cặp - Multiple comparisons of Dunnett T3 (giả định phương sai không đồng nhất) với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Phân tích tỷ lệ sống Kaplan-Meier (Survival analysis) và tất cả đồ thị được xử lý và vẽ bằng phần mềm Excel.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên mật độ vi khuẩn *V. alginolyticus*

Sóng siêu âm tần số 20 kHz có khả năng làm giảm mật độ vi khuẩn *V. alginolyticus* và khả năng này phụ thuộc vào thời gian xử lý. Mật độ vi khuẩn giảm dần khi thời gian xử lý với sóng siêu âm tần số thấp tăng dần và hoàn toàn bất hoạt ở thời gian 30 phút (Hình 2).

Các nghiên cứu trước đây cho thấy sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) gây tổn thương tế bào và làm chết vi khuẩn đáng kể trong thời gian 20 phút, đặc biệt gây chết hoàn toàn các loại vi khuẩn Gram (-) như *Enterobacter aerogenes* và *Bacillus subtilis* khi xử lý trong thời gian 30 phút.



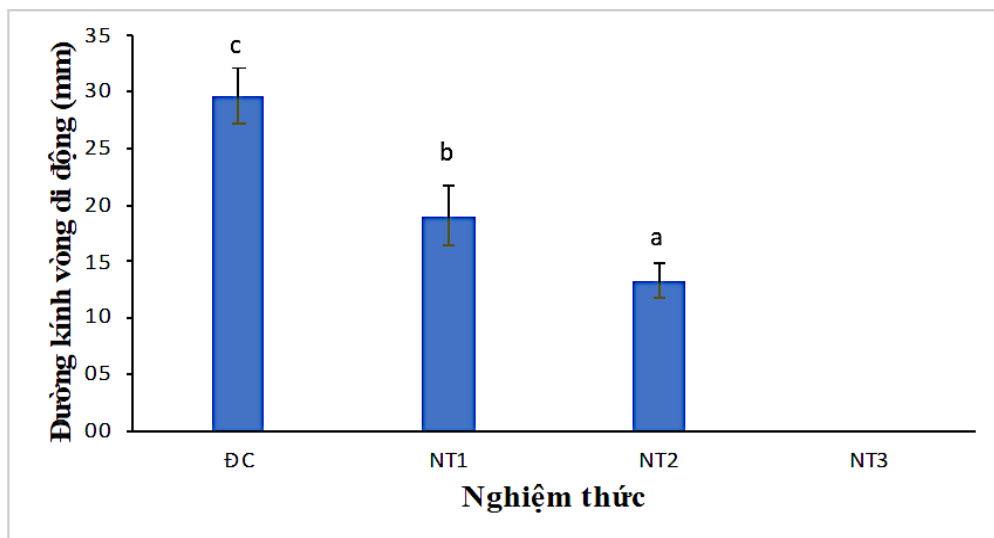
Hình 2. Mật độ vi khuẩn khi xử lý bằng sóng siêu âm (20kHz) trong 10 phút (NT1), 20 phút (NT2), 30 phút (NT3) và nghiệm thức đối chứng (ĐC) không xử lý bằng siêu âm

Chú thích: Số liệu được biểu diễn ở dạng Mean \pm SD, các ký tự a,b,c khác nhau chỉ sự khác biệt thống kê ($p < 0.05$) giữa các nghiệm thức.

Sóng siêu âm có khả năng tiêu diệt vi khuẩn ở pha tăng trưởng (exponential growth phase) tốt hơn ở pha cân bằng (stationary phase). Tuy nhiên, khả năng gây chết của sóng siêu âm tần số thấp giảm đối với các loại cầu khuẩn Gram (+) có cấu trúc màng tế bào dày như *Staphylococcus* [6, 21]. Kết quả nghiên cứu này đã khẳng định sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) đã làm giảm mật độ vi khuẩn và có khả năng tiêu diệt hoàn toàn phẩy khuẩn Gram (-) như *V. alginolyticus* trong 30 phút.

3.2 Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên khả năng di động của vi khuẩn *V. alginolyticus*

Vi khuẩn *V. alginolyticus* khi xử lý với sóng siêu âm ở các mức thời gian khác nhau đã làm giảm khả năng di động so với lô đối chứng ($p < 0,05$) (Hình 3). Trong đó, đường kính vòng di động thấp nhất ở nghiệm thức NT2 chỉ đạt khoảng 12 mm. Khả năng di động là một yếu tố độc lực quan trọng của vi khuẩn giúp vi khuẩn tiếp cận và kí sinh lên vật chủ [22]. Khả năng di động của vi khuẩn phụ thuộc vào hoạt động của tiên mao nằm trên màng tế bào, dưới tác dụng của siêu âm tần số thấp đã làm màng tế bào bị phá huỷ [23]. Do đó hoạt động của tiên mao bị cản trở làm giảm khả năng di động của vi khuẩn. Khả năng di động của vi khuẩn có tính định hướng theo gradient của một hoá chất nhất định hay còn gọi là hoá hướng động (chemotaxis). Sự kết hợp giữa di động và hoá hướng động cho phép vi khuẩn phát hiện và tiếp cận chất dinh dưỡng cho sự kí sinh của vi khuẩn. Sự di động của vi khuẩn gây bệnh đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn đầu của quá trình gây nhiễm và sau đó nó không cần thiết khi quá trình gây nhiễm đã thành công [22]. Như vậy, trong thí nghiệm này cho thấy sóng siêu âm tần số thấp đã làm giảm khả năng hoạt động của tiên mao từ đó làm giảm độc lực của vi khuẩn *V. alginolyticus*. Ở nghiệm thức NT3, sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) đã làm chết vi khuẩn *V. alginolyticus* nên không có hiện tượng di động xảy ra.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên khả năng di động của vi khuẩn *V. alginolyticus*

Chú thích: Số liệu được biểu diễn ở dạng Mean ± SD, các kí tự a, b, c khác nhau chỉ sự khác biệt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức.

3.3 Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên hoạt tính một số enzyme do *V. alginolyticus* sản xuất (lipase, phospholipase, caseinase, và haemolysin)

Một số yếu tố độc lực như khả năng thủy phân của các loại enzyme (lipase, caseinase, phospholipase, và haemolysin) chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* được trình bày ở Bảng 1. Từ kết quả Bảng 1 cho thấy, sóng siêu âm tần số thấp đã làm giảm hoạt động sản xuất các loại enzyme lipase, caseinase, phospholipase, và haemolysin của vi khuẩn *V. alginolyticus* thông qua tỷ lệ đường kính thủy phân enzyme và đường kính khuẩn lạc ở các nghiệm thức có xử lý sóng siêu âm (NT1, NT2) giảm so với nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức NT3 không thấy xuất hiện hoạt động thủy phân của các loại enzyme đã cho phép khẳng định vi khuẩn đã bị chết sau 30 phút tiếp xúc với sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz).

Các enzyme ngoại bào của vi khuẩn *V. alginolyticus* như lipase, phospholipase, haemolysin, và caseinase góp phần tạo độc lực của vi khuẩn, đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhập và gây bệnh ở vật chủ [23]. Enzyme lipase phân cắt các triacylglycerols mạch dài thành các acid béo và glycerol, trong khi đó phospholipase là khả năng thủy phân phospholipid thành các acid béo do đó các enzyme này có thể có vai trò quan trọng trong quá trình phá hủy màng lipid của tế bào để vi khuẩn xâm nhập vào vật chủ và gây các tổn thương lên mô của vật chủ [24, 25]. Caseinase là một enzyme thuộc nhóm protease xúc tác quá trình phân giải, phân hủy protein thành các polypeptide nhỏ hơn hoặc các acid amin giúp vi khuẩn phá hủy mô tế bào vật chủ và gây bệnh [25]. Ngoài ra vi khuẩn còn tiết ra enzyme haemolysin phá vỡ tế bào hồng cầu làm mất chức năng sinh lý của hồng cầu [24, 25]. Các enzyme này là những yếu tố độc lực quan trọng của

Bảng 1. Ảnh hưởng của sóng siêu âm tần số thấp lên một số yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*

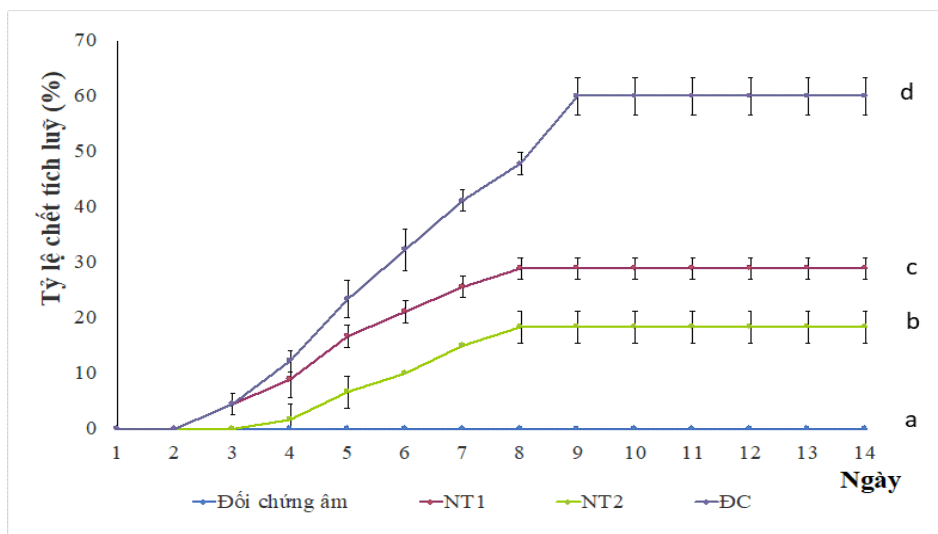
Nghiệm thức	Tỷ lệ đường kính vùng thủy phân enzyme và đường kính khuẩn lạc			
	Lipase	Phospholipase	Caseinase	Haemolysin
ĐC	2,1 ^d ± 0,15	2,0 ^d ± 0,05	1,8 ^d ± 0,10	2,3 ^d ± 0,10
NT1	1,6 ^c ± 0,10	1,7 ^c ± 0,06	1,6 ^c ± 0,06	1,5 ^c ± 0,12
NT2	1,2 ^b ± 0,06	1,1 ^b ± 0,05	1,3 ^b ± 0,05	1,1 ^b ± 0,06
NT3	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Chú thích: Số liệu được biểu diễn ở dạng Mean ± SD, các kí tự a,b,c khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự khác biệt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức.

nhiều vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio*, *Aeromonas*... liên quan trực tiếp đến đặc điểm bệnh lý của những bệnh do nhóm vi khuẩn này gây ra [23, 25]. Chưa có nghiên cứu nào về tác động của sóng siêu âm lên các yếu tố độc lực của vi khuẩn. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây cho thấy siêu âm tần số thấp gây tổn thương lên các thành phần nội bào và làm biến tính các enzyme như lipase và caseinase của vi sinh vật do hiện tượng cavitation [26–28]. Nghiên cứu này đã cho thấy ảnh hưởng của sóng siêu âm tần số thấp đã làm giảm các yếu tố độc lực của vi khuẩn *V. alginolyticus*.

3.4 Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên khả năng gây bệnh của vi khuẩn *V. alginolyticus* trên cá Hồng mỹ

Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) lên khả năng gây bệnh của vi khuẩn *V. alginolyticus* trên cá Hồng mỹ được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của sóng siêu âm lên khả năng gây bệnh của vi khuẩn *V. alginolyticus* lên cá Hồng mỹ

Tỷ lệ sống của cá Hồng mỹ cảm nhiễm với vi khuẩn *V. alginolyticus* sau khi xử lý sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng (ĐC) ($p < 0,05$). Cá cảm nhiễm với vi khuẩn không xử lý với sóng siêu âm (ĐC) có tỷ lệ chết tích lũy lên đến 60% (Hình 4). Tất cả cá chết trong thí nghiệm đều có dấu hiệu bỏ ăn, bơi lờ đờ và mắt cá lồi, đục, vây và đôi mòn và rách như miêu tả của Phạm Thị Hải Yến và cs. [14] (Hình 5) và *V. alginolyticus* được tái phân lập từ mẫu thận của cá mang dấu hiệu bệnh lý trên. Cá ở nghiệm thức đối chứng âm (tiêm nước muối sinh lý) có tỷ lệ sống 100% và không có dấu hiệu của bệnh. Dựa vào các kết quả nghiên cứu trên có thể kết luận rằng sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) đã làm giảm độc lực của vi khuẩn *V. alginolyticus*, do đó làm giảm tỷ lệ chết của cá Hồng mỹ.



Hình 5. Cá Hồng mỹ có dấu hiệu bệnh lý mắt lồi đục, vây và đuôi mòn cụt khi cảm nhiễm với vi khuẩn *V. alginolyticus*

4 Kết luận và Kiến nghị

3.5 Kết luận

Sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) gây bất hoạt vi khuẩn *V. alginolyticus* khi xử lý trong thời gian 30 phút. Ở thời gian xử lý ngắn hơn, sóng siêu âm tần số thấp (20 kHz) làm giảm khả năng di động và hoạt tính của các enzyme lipase, caseinase, phospholipase, và haemolysin cũng như khả năng gây bệnh của vi khuẩn *V. alginolyticus* trên cá Hồng mỹ.

3.6 Kiến nghị

Đây là nghiên cứu đầu tiên về ảnh hưởng của sóng siêu âm tần số thấp trong việc làm giảm mật độ và các yếu tố độc lực của vi khuẩn *V. alginolyticus*, tuy nhiên nghiên cứu chỉ mới tiến hành trên một chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*. Cần tiến hành đánh giá trên nhiều chủng khác nhau để có thể đưa ra khuyến cáo về việc ứng dụng sóng siêu âm tần số thấp trong hạn chế mật độ và khả năng gây bệnh của vi khuẩn *V. alginolyticus* trên cá Hồng mỹ.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ mã số B2024-DHH-07. Xin cảm ơn những hỗ trợ của Trường phổ thông Liên cấp Newton, Hà Nội trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

1. Shung, K. K., Cannata, J. M., & Zhou, Q. F. (2007), Piezoelectric materials for high frequency medical imaging applications: A review, *Journal of Electroceramics*, 19, 141–147.
2. Laborde, J. L., Bouyer, C., Caltagirone, J. P., & Gérard, A. (1998), Acoustic bubble cavitation at low frequencies, *Ultrasonics*, 36(1–5), 589–594.
3. Ashokkumar, M. (2015), Applications of ultrasound in food and bioprocessing, *Ultrasonics sonochemistry*, 25, 17–23.
4. O'donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010), Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance, *Trends in food science & technology*, 21(7), 358–367.
5. Ashokkumar, M. (2011), The characterization of acoustic cavitation bubbles—an overview, *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 864–872.
6. Chen, F., Zhang, M., & Yang, C. H. (2020), Application of ultrasound technology in processing of ready-to-eat fresh food: A review, *Ultrasonics sonochemistry*, 63, 104953.
7. Zupanc, M., Pandur, Ž., Perdih, T. S., Stopar, D., Petkovšek, M., & Dular, M. (2019), Effects of cavitation on different microorganisms: The current understanding of the mechanisms taking place behind the phenomenon. A review and proposals for further research, *Ultrasonics sonochemistry*, 57, 147–165.
8. Pokhrel, P. R., Bermúdez-Aguirre, D., Martínez-Flores, H. E., Garnica-Romo, M. G., Sablani, S., Tang, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2017), Combined effect of ultrasound and mild temperatures on the inactivation of *E. coli* in fresh carrot juice and changes on its physicochemical characteristics, *Journal of Food Science*, 82(10), 2343–2350.
9. Chahine, G. L., & Hsiao, C. T. (2015), Modelling cavitation erosion using fluid–material interaction simulations, *Interface focus*, 5(5), 20150016.
10. Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., ... & Ma, H. (2017), Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity, *Ultrasonics sonochemistry*, 37, 144–149.
11. Gao, S., Hemar, Y., Lewis, G. D., & Ashokkumar, M. (2014), Inactivation of *Enterobacter aerogenes* in reconstituted skim milk by high-and low-frequency ultrasound, *Ultrasonics sonochemistry*, 21(6), 2099–2106.
12. Cameron, M., McMaster, L. D., & Britz, T. J. (2010), Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components, *Dairy Science & Technology*, 90(1), 119–119.

13. Yen, P. T. H., Tram, N. D. Q., Linh, N. Q. (2022), Isolation and determination of *Vibrio* spp. pathogen from *Sciaenops ocellatus* suffering from hemorrhagic disease under cage culture in Vietnam, *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10(2), 405–415. [http://dx.doi.org/10.18006/2022.10\(2\)](http://dx.doi.org/10.18006/2022.10(2)).
14. Phạm Thị Hải Yến, Nguyễn Quang Linh, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Nguyễn Anh Hiếu, (2021), Khả năng kháng khuẩn của cao chiết Diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) đối với vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*), *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Kỹ thuật và Công nghệ*, 130(2A), 67–79. <https://doi.org/10.26459/hueunijtt.v130i2A.6570>.
15. Bunpa, S., Nishibuchi M., Thawonsuwan J., & Sermwittayawong N. (2018), Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* strains, and design of a PCR-based identification method using gyrB gene sequence, *Canadian Journal of microbiology*, 64(1), 1–10.
16. Li, X. C., Xiang, Z., Xu, X. M., Yan, W. H., and Ma, J. M. (2009), Endophthalmitis caused by *Vibrio alginolyticus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10), 3379–3381.
17. Ayukekbong, J. A., Ntemgwa, M., Atabe, A., N. (2017), The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies, *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1), 47.
18. Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J-C., Combe, M., Pepey, E., et al. (2020), Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance, *Nature Communications*, 11(1), 1870.
19. Miles, A., Misra, S., Irwin, J. (1938), The estimation of the bactericidal power of the blood, *Epidemiology & Infection*, 38, 732–749.
20. Yang, Q., Anh, N. D., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2014), Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*, *Frontiers in microbiology*, 5, 584.
21. Gao, S., Lewis, G. D., Ashokkumar, M., & Hemar, Y. (2014), Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria, *Ultrasonics sonochemistry*, 21(1), 446–453.
22. Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2002), The role of motility as a virulence factor in bacteria, *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605–614.
23. Darshanee Ruwandeepika, H. A., Sanjeeva Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2012), Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade, *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 59–74.
24. Istivan, T. S., & Coloe, P. J. (2006), Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis, *Microbiology*, 152(5), 1263–1274.

25. Darshanee Ruwandeepika, H. A., Sanjeewa Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2012), Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade, *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 59–74.
26. Marx, G., Moody, A., & Bermúdez-Aguirre, D. (2011), A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication, *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 327–337.
27. Kon, T., Nakakura, S., & Mitsubayashi, K. (2005), Intracellular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* using CLSM after ultrasonic treatments, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(2), 159–163.
28. Guzel, B. H., Arroyo, C., Condón, S., Pagán, R., Bayindirli, A., & Alpas, H. (2014), Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal temperatures (manothermosonication) in acidic fruit juices, *Food and Bioprocess technology*, 7, 1701–1712.