



NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *VIBRIO* PHÂN LẬP TỪ CÁ BIỂN NUÔI LỒNG BỊ BỆNH XUẤT HUYẾT TẠI VÙNG VEN BIỂN THÀNH PHỐ HUẾ

Nguyễn Nam Quang, Nguyễn Thị Huế Linh, Nguyễn Đức Quỳnh Anh,
Nguyễn Thị Xuân Hồng, Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước*

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

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Ngọc Phước <nguyenngocphuoc@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 11-2-2025; Ngày chấp nhận đăng: 9-3-2025)

Tóm tắt. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết tại vùng ven biển Thành phố Huế. Các chủng vi khuẩn phân lập được tiến hành xác định đặc điểm sinh hóa bằng bộ kit API20E và định danh bằng MALDI ToF. Xác định khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường Mueller – Hinton Agar (MHA) với 7 loại kháng sinh thuộc 7 nhóm: Beta-lactams, Aminoglycosides, Macrolides, Fluoroquinolones, Phenicol, Tetracyclines, Sulfonamides. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*, 4 chủng *V. parahaemolyticus*, và 5 chủng *V. vulnificus* trên cá biển bị bệnh xuất huyết nuôi lồng tại Thành phố Huế. Các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* nhạy với 5/7 loại kháng sinh thử nghiệm và kháng với 2/7 loại kháng sinh là Oxacillin (1 µg) và Sulfamethoxazole/Trimethoprim (3,75/1,25 µg).

Từ khóa: cá Hồng mỹ, cá chẽm, cá tráp, kháng sinh, nuôi trồng thủy sản, *Vibrio*

Study on antibiotic resistance of *Vibrio* isolated from hemorrhagic diseased marine fish in cage-cultured in coastal area of Hue city, Vietnam

Nguyen Nam Quang, Nguyen Thi Hue Linh, Nguyen Duc Quynh Anh,
Nguyen Thi Xuan Hong, Truong Thi Hoa, Nguyen Ngoc Phuoc*

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

* Correspondence to Nguyen Ngoc Phuoc <nguyenngocphuoc@hueuni.edu.vn>

(Submitted: February 11, 2025; Accepted: March 9, 2025)

Abstract. This study aimed to assess the antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from hemorrhagic diseased fish in cage-cultured farms in coastal area of Hue city, Vietnam. The isolated bacterial strains were biochemically characterized by API20E kit and identified by MALDI-ToF technique. Antibiotic resistance of isolated were determined using the disk diffusion method on Mueller-Hinton Agar (MHA), testing seven antibiotics from seven different groups: Beta-lactams, Aminoglycosides, Macrolides, Fluoroquinolones, Phenicols, Tetracyclines and Sulfonamides were tested. The research results isolated 18 strains of *V. alginolyticus*, 4 strains of *V. parahaemolyticus*, and 5 strains of *V. vulnificus* from hemorrhagic diseased marine fish in cage-cultured in Hue city. All isolates of *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* were susceptible to 5 out of 7 tested antibiotics and resistant to two antibiotics consisting of Oxacillin (1 µg) and sulfamethoxazole/trimethoprim (3,75/1,25 µg).

Keywords: antibiotic, aquaculture, *Vibrio*, red drum, sea bass, sea bream

1 Đặt vấn đề

Bệnh do nhóm vi khuẩn *Vibrio* (Vibriosis) gây tác hại lớn tới nhiều loài cá biển và động vật thủy sản nói chung với tỷ lệ gây chết có thể lên tới 50% ở tất cả các giai đoạn phát triển, các dấu hiệu bệnh lý phổ biến gồm: bơi lơ dờ, bỏ ăn, xuất hiện vết loét trên cơ thể, thối vây, xuất huyết ở gan, thận và lá lách [1] và có thể gây nhiễm khuẩn toàn thân [2]. Tại Việt Nam, nghề nuôi cá biển mang lại giá trị kinh tế cao, tập trung ở Quảng Ninh, Hải Phòng, Khánh Hòa, Kiên Giang và các tỉnh thành ven biển như Quảng Trị, Quảng Bình và Thừa Thiên Huế [3]. Vibriosis là bệnh phổ biến trên cá biển nuôi lồng ven biển tại Thành phố Huế [4, 5] trong đó *Vibrio alginolyticus* được xem là tác nhân chính gây nên dịch bệnh nghiêm trọng cho các đối tượng nuôi [6, 7].

Kháng sinh được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản để điều trị các bệnh do vi khuẩn gây ra. Theo thống kê giai đoạn 2008-2018 đã có khoảng 44,77 triệu tấn kháng sinh được sử dụng tại châu Á – khu vực cung ứng chính sản phẩm thủy sản toàn cầu [8]. Việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản đã tạo ra các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng tới sức khỏe con người [9–12]. Trung Quốc, Bangladesh, Việt Nam là những quốc gia sử dụng nhiều thuốc kháng sinh trong hoạt động nuôi trồng thủy sản [8]. Miền

Bắc Việt Nam sử dụng phổ biến khoảng 11 loại kháng sinh phổ rộng, trong đó dùng nhiều nhất gồm Oxytetracycline, Tetracycline và Enrofloxacin. Khu vực miền Trung, có tới 71,2% hộ nuôi trồng thủy sản sử dụng hơn 10 loại kháng sinh trong quá trình sản xuất. Miền Nam có khoảng 69,8% hộ nuôi sử dụng hơn 15 loại kháng sinh, phổ biến nhất gồm Oxytetracycline, Doxycycline và Enrofloxacin [13]. Thực trạng sử dụng kháng sinh tại Việt Nam đang gây ra những nguy cơ lớn ảnh hưởng tới môi trường, sức khỏe vật nuôi và sức khỏe người tiêu dùng [14].

Nghiên cứu này thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết tại tỉnh Thừa Thiên Huế nhằm cung cấp những dữ liệu khoa học và thực tiễn về tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn, góp phần thực hiện chương trình hành động toàn cầu về tình trạng kháng kháng sinh – GAP on AMR (Global Action Plan on Antimicrobial Resistance) trong chiến lược “Một sức khỏe – One Health” của liên minh ba bên WHO-FAO-WOAH (World Health Organization – Food and Agriculture Organization – World Organisation Animal Health) [15].

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Thu mẫu cá bệnh

Tiến hành thu tổng cộng 18 mẫu cá biển nuôi lồng với những dấu hiệu bệnh lý điển hình của bệnh xuất huyết (xuất huyết trên cơ thể hoặc có vết loét trên thân) tại 04 hộ nuôi cá biển tại huyện Phú Lộc và huyện Phú Vang, Thành phố Huế theo phương pháp thu mẫu chọn lọc. Thời gian, địa điểm thu mẫu và kích cỡ cá nhiễm bệnh được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1.

Cá được gây mê bằng dung dịch Aqui-S Aquatic anaesthetic (New Zealand) nồng độ 150 mL/L. Tiến hành phân lập vi khuẩn bằng cách dùng ethanol 90% sát trùng toàn bộ cơ thể cá, sau đó giải phẫu. Mẫu vi khuẩn được lấy trực tiếp từ thận trước của cá, sau đó được cấy trên môi trường Tryptone Soy Agar bổ sung 2% NaCl (TSA⁺, Himedia, Ấn Độ) và môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS, HiMedia, Ấn Độ). Các đĩa môi trường sau khi phân lập vi khuẩn được chuyển về phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm và ủ trong tủ ấm ở 28 °C, quan sát sự phát triển của khuẩn lạc vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy. Tiến hành chọn các khuẩn lạc rời chiếm ưu thế để cấy chuyển tạo dòng thuần trên môi trường TCBS. Các mẫu vi khuẩn thuần chủng được lưu trữ trên đĩa thạch TCBS để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Thời gian, địa điểm thu mẫu và kích cỡ cá nhiễm bệnh

Thời gian	Địa điểm	Loài	Số lượng (con)	Chiều dài (cm) (Mean $\pm$ SD)	Trọng lượng (g) (Mean $\pm$ SD)
3/2024	Phú Lộc	Hồng mỹ (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	4	28,02 $\pm$ 1,18	388,10 $\pm$ 17,05
		Chêm (<i>Lates calcarifer</i>)	3	27,43 $\pm$ 0,81	380,53 $\pm$ 9,85
		Tráp (<i>Acanthopagrus schlegelii</i>)	2	23,50 $\pm$ 0,70	320,40 $\pm$ 14,28
4/2024	Phú Vang	Hồng mỹ (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	6	37,65 $\pm$ 1,45	593,38 $\pm$ 64,58
		Chêm (<i>Lates calcarifer</i>)	3	33,16 $\pm$ 0,66	420,56 $\pm$ 1,00



Hình 1. Thu mẫu và phân lập vi khuẩn *Vibrio* từ cá biển nuôi lồng có dấu hiệu bệnh xuất huyết
(1.A – cá Hồng mỹ, 1.B – cá Chêm, 1.C – cá Tráp)

2.2 Phương pháp xác định đặc điểm sinh hóa vi khuẩn

Nhuộm Gram: các chủng vi khuẩn phân lập được nhuộm Gram bằng bộ thuốc nhuộm MI 001ST (Công ty TNHH Dịch vụ và thương mại Nam Khoa, Việt Nam), tiêu bản được quan sát bằng kính hiển vi quang học (KERN OBE 132, Đức) ở các độ phóng đại 10x, 40x, 100x để xác định hình thái vi khuẩn.

Phản ứng catalase: dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn phết trên lam kính, nhỏ 1 - 2 giọt H_2O_2 30%. Sau 1 - 2 giây bọt khí xuất hiện phản ứng dương tính (+), không có hiện tượng sủi bọt khí phản ứng âm tính (-).

Phản ứng oxidase: sử dụng que cấy phết khuẩn lên đĩa giấy đã có sẵn enzyme oxidase; sau 30 giây nếu đĩa giấy đổi từ màu trắng sang tím đen phản ứng dương tính (+), không đổi màu phản ứng âm tính (-).

Kết hợp sử dụng bộ kit API20E (Analytical Profile Index, Bio-Mérieux, Pháp) để xác định đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3 Phương pháp định danh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được định danh bằng kỹ thuật MALDI- ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) tại Phòng thí nghiệm sinh học phân tử, Khoa Thủy sản, Đại học Sydney, Úc.

2.4 Phương pháp nghiên cứu khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn

Kháng sinh sử dụng được lựa chọn dựa trên cơ sở: (i) danh mục thuốc kháng sinh thông dụng trong nuôi trồng thủy sản được phép lưu hành và đang được các công ty thương mại hóa tại Việt Nam [16]; (ii) danh mục một số kháng sinh phát hiện tồn dư nhiều trong sản phẩm thủy sản theo công văn 7499/BN-NT ngày 09/11/2022 của Bộ NN&PTNT [14]; (iii) một số loại kháng sinh khác sử dụng trên người và động vật. Phạm vi kháng sinh này cho phép đánh giá toàn diện các đặc điểm kháng thuốc của các chủng vi khuẩn *Vibrio* qua các nhóm kháng sinh khác nhau để cung cấp cơ sở dữ liệu về kháng kháng sinh theo mục tiêu của chương trình hành động toàn cầu về tình trạng kháng kháng sinh – GAP on AMR (Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, 2015) trong chiến lược “Một sức khỏe – One Health” của liên minh ba bên WHO-FAO-WOAH (World Health Organization – Food and Agriculture Organization – World Organisation Animal Health, 2015) [15].

Sử dụng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch Mueller Hilton Agar (MHA, Himedia, Ấn Độ) của Uwizeyimana và cs., [17] để xác định khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết.

Các bước tiến hành

Vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh trong 10 mL Tryptone Soya Broth (TSB, HiMedia, Ấn Độ) bổ sung 2% NaCl ở 28 °C trên máy lắc SK-L330-Pro (DLAB Scientific Lnc, Hoa Kỳ) với tốc độ 150 vòng/phút trong 24 giờ. Xác định mật độ tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 600 nm trên máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản), giá trị OD = 1 (tương đương mật độ vi khuẩn 10^9 CFU/mL) [18].

Sau đó vi khuẩn được pha loãng đến mật độ 10^6 CFU/mL, lấy 100 μ L dịch huyền phù vi khuẩn dàn đều trên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường MHA. Để đĩa môi trường đã chứa vi khuẩn khô tự nhiên ở điều kiện nhiệt độ phòng trong 30 phút sau đó dùng kẹp khử trùng gấp các đĩa giấy có tấm kháng sinh (Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa, Việt Nam) cho vào đĩa môi trường, nhấn đều xung quanh đĩa kháng sinh và bảo quản trong tủ ấm 28 °C. Tiến hành đo đường kính vòng vô khuẩn trên đĩa thạch sau 24 giờ.

Đánh giá khả năng nhạy hay kháng của 7 loại kháng sinh (Bảng 2) đối với các chủng vi khuẩn dựa trên đường kính vòng vô khuẩn và tham chiếu theo tiêu chuẩn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M45 Edition 3, [19].

Bảng 2. Các loại kháng sinh sử dụng để nghiên cứu khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn

STT	Nhóm	Loại kháng sinh	Ký hiệu	Hàm lượng
1	Beta-lactams	Oxacillin	Ox	1 µg
2	Aminoglycoside	Gentamycin	Ge	10 µg
3	Macrolide	Erythromycin	Er	15 µg
4	Fluoroquinolones	Enrofloxacin	Ef	5 µg
5	Phenicol	Florfenicol	Fl	30 µg
6	Tetracycline	Doxycycline	Dx	30 µg
7	Sulfonamides	Sulfamethoxazole/Trimethoprim	Bt	23,75/1,25 µg

2.6 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2013 để tính giá trị trung bình (Mean) và độ lệch chuẩn (SD).

3 Kết quả nghiên cứu và thảo luận

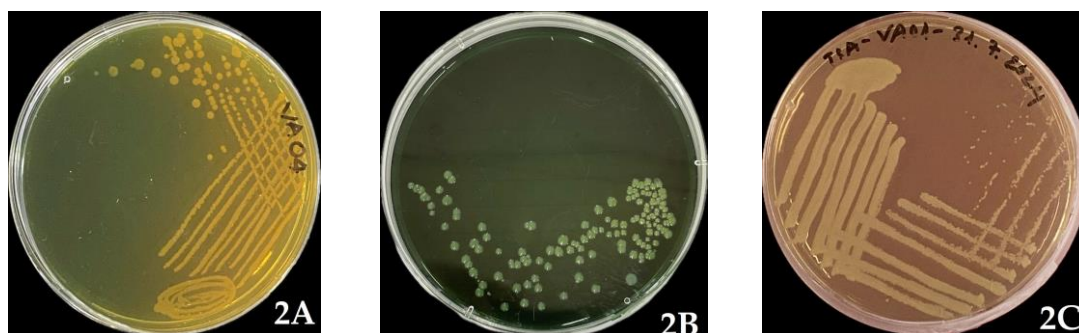
3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn

Kết quả đã phân lập được 27 chủng vi khuẩn trên môi trường TCBS cho hai dạng khuẩn lạc có màu sắc khác nhau từ 18 mẫu cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết (Bảng 3). Trong đó, 18 chủng tạo khuẩn lạc màu vàng kí hiệu TTH001 đến TTH018 (Hình 2-A) và 9 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu xanh được ký hiệu TTH019 đến TTH027 (Hình 2-B). Tất cả các chủng vi khuẩn khi phát triển trên môi trường TSA (có bổ sung 2% NaCl) tạo khuẩn lạc màu trắng (Hình 2-C). Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn có dạng hình tròn, lồi và đường kính dao động từ 1–3 mm. Đặc biệt có 4/9 mẫu cá thu thập tại Phú Lộc và 5/9 mẫu cá tại Phú Vang xuất hiện đồng thời hai loại khuẩn lạc xanh và vàng trên cùng một môi trường nuôi cấy TCBS.

Sự xuất hiện các khuẩn lạc màu vàng hoặc xanh trên môi trường TCBS liên quan đến quá trình lên men đường của vi khuẩn thuộc nhóm *Vibrio*: khi vi khuẩn lên men đường sẽ làm pH môi trường thạch TCBS bị acid hóa làm cho Bryothymol blue có trong thành phần TBBS chuyển sang màu vàng. Nếu quá trình lên men xảy ra chậm hoặc vi khuẩn không có khả năng lên men đường sẽ làm cho pH môi trường cao (tính bazo) khuẩn lạc tạo thành sẽ có màu xanh. Thông thường pH của môi trường của TCBS ở mức 8,6, khi pH thay đổi sẽ ảnh hưởng tới màu sắc của khuẩn lạc [20].

Bảng 3. Kết quả phân lập vi khuẩn từ mẫu cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết

Thời gian	Địa điểm	Loài	Số lượng (con)	Số chủng vi khuẩn trên môi trường TCBS	
				Khuẩn lạc vàng	Khuẩn lạc xanh
3/2024	Phú Lộc	Hồng mỹ (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	4	4	0
		Chēm (<i>Lates calcarifer</i>)	3	3	2
		Tráp (<i>Acanthopagrus schlegelii</i>)	2	2	2
4/2024	Phú Vang	Hồng mỹ (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	6	6	2
		Chēm (<i>Lates calcarifer</i>)	3	3	3

**Hình 2.** Hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết trên môi trường nuôi cấy (2A – màu vàng trên TCBS, 2B – màu xanh trên TCBS, 2C – màu trắng trên TSA⁺)

3.2 Kết quả xác định các đặc điểm sinh hóa và định danh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn phân lập được đều là vi khuẩn Gram âm có dạng hình dấu phẩy, bắt màu hồng thuốc nhuộm. Đặc điểm hình thái vi khuẩn giống với mô tả của Baker-Austin và cs. [21], về vi khuẩn *Vibrio*: các loài *Vibrio* thuộc họ Vibrionaceae thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, có dạng thẳng, cong hoặc hình dấu phẩy, kỵ khí tùy nghi, có khả năng di động được tìm thấy phổ biến trong môi trường nuôi trồng thủy sản, các vùng nước ven biển, trầm tích. Kết quả khảo sát đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được thể hiện ở Bảng 4, 5, 6.

Bảng 4. Đặc điểm sinh hóa các chủng vi khuẩn *Vibrio* tạo khuẩn lạc vàng trên môi trường TCBS

TT	Chỉ tiêu	<i>Vibrio alginolyticus</i> (Buller,) [22]	Tỷ lệ % chủng vi khuẩn phân lập (n = 18)	
			Dương tính	Âm tính
1	Nhuộm Gram	-	0	100
2	Hình thái	Dấu phẩy	Dấu phẩy	
3	Khuẩn lạc trên TCBS	Vàng	Vàng	
4	Khuẩn lạc trên TSA+	Không mô tả	Trắng	
5	Oxidase	+	100	0
6	Catalase	+	100	0
7	Sinh H ₂ S	-	0	100
8	Phân giải NO ₃	+	100	0
9	Indol	-	0	100
10	Voges-Proskauer	+	100	0
11	Sử dụng Citrate	+	100	0
12	Glucose	+	100	0
13	Mannitol	+	100	0
14	Sorbitol	+	100	0
15	Sucrose	+	100	0
16	Arabinose	-	0	100
17	API 20E	414725	414725	

Ghi chú: (+): phản ứng dương tính, (-): phản ứng âm tính

Bảng 5. Đặc điểm sinh hóa các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá biển bị bệnh xuất huyết nuôi lồng tại Phú Lộc tạo khuẩn lạc xanh trên môi trường TCBS

TT	Chỉ tiêu	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Aly và cs.,) [23]	Tỷ lệ % chủng vi khuẩn phân lập (n = 4)	
			Dương tính	Âm tính
1	Nhuộm Gram	-	0	100
2	Hình thái	Dấu phẩy	Dấu phẩy	
3	Khuẩn lạc trên TCBS	Xanh	100	
4	Khuẩn lạc trên TSA+	Không mô tả	Trắng	
5	Oxidase	+	100	0
6	Catalase	+	100	0
7	Sinh H ₂ S	-	0	100
8	Phân giải NO ₃	-	0	100
9	Indol	+	100	0
10	Voges-Proskauer	+	100	0
11	Sử dụng Citrate	-	0	100
12	Glucose	-	0	100
13	Mannitol	-	0	100

TT	Chỉ tiêu	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Aly và cs.,) [23]	Tỷ lệ % chủng vi khuẩn phân lập (n = 4)	
			Dương tính	Âm tính
14	Sorbitol	-	0	100
15	Sucrose	+	100	0
16	Arabinose	-	0	100
17	API 20E	414610	414610	

Ghi chú: (+): phản ứng dương tính, (-): phản ứng âm tính

Bảng 6. Đặc điểm sinh hóa các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá biển bị bệnh xuất huyết nuôi lồng tại Phú Vang tạo khuẩn lạc xanh trên môi trường TCBS

TT	Chỉ tiêu	<i>Vibrio vulnificus</i> (Amaro và Biosca,) [24]	Tỷ lệ % chủng vi khuẩn phân lập (n = 5)	
			Dương tính	Âm tính
1	Nhuộm Gram	-	0	100
2	Hình thái	Dấu phẩy	Dấu phẩy	
3	Khuẩn lạc trên TCBS	Xanh	100	
4	Khuẩn lạc trên TSA+	Không mô tả	Trắng	
5	Oxidase	+	100	0
6	Catalase	+	100	0
7	Sinh H ₂ S	+	100	0
8	Phân giải NO ₃	-	0	100
9	Indol	+	100	0
10	Voges-Proskauer	+	100	0
11	Sử dụng Citrate	-	0	100
12	Glucose	-	0	100
13	Mannitol	-	0	100
14	Sorbitol	-	0	100
15	Sucrose	-	0	100
16	Arabinose	-	0	100
17	API 20E	514610	514610	

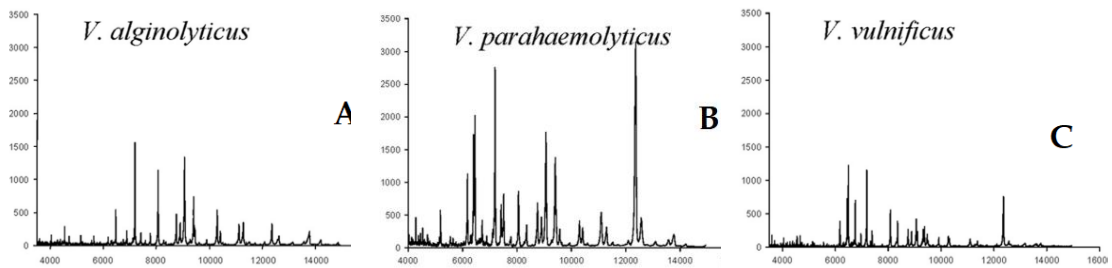
Ghi chú: (+): phản ứng dương tính, (-): phản ứng âm tính

Tiến hành đối chiếu đặc điểm sinh hóa chủng vi khuẩn mô tả của Buller, [22] cho thấy 18/18 chủng vi khuẩn (TTH001 – TTH018) tương đồng 100% về các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn *V. alginolyticus* với giá trị API 20E là 414725. 4/9 chủng (TTH019, TTH021, TTH023, TTH027) hoàn toàn trùng với đặc điểm sinh hoá của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của Aly và cs., [23] và cho kết quả API là 414610. 5/9 chủng (TTH020, TTH022, TTH024, TTH025, TTH026) cho kết quả API 20E là 514610 và tương đồng với các đặc điểm sinh

hoá các chủng vi khuẩn *V. vulnificus* như nghiên cứu của Amaro và Biosca, [24]. Mặc dù cả 9 chủng vi khuẩn đều tạo khuẩn lạc xanh trên môi trường TCBS nhưng kết quả định danh cho thấy 4 chủng vi khuẩn phân lập từ Phú Lộc là *V. parahaemolyticus* còn 5 chủng vi khuẩn phân lập từ Phú Vang là *V. vulnificus*. Sự khác biệt này là do màu sắc của khuẩn lạc có thể bị chi phối bởi yếu tố pH của môi trường TCBS sử dụng để nuôi cấy [23].

Kết quả định danh bằng phương pháp MALDI- ToF (Hình 3) cho kết quả 18/18 (100%) chủng vi khuẩn (TTH001–TTH018) phân lập được là *V. alginolyticus*. 4/9 (44,44%) chủng vi khuẩn (TTH019, TTH021, TTH023, TTH027) là *V. parahaemolyticus* và 5/9 (55,56%) chủng (TTH020, TTH022, TTH024, TTH025, TTH026) là vi khuẩn *V. vulnificus*. Như vậy kết quả định danh bằng API 20E trùng với kết quả định danh bằng MALDI-ToF.

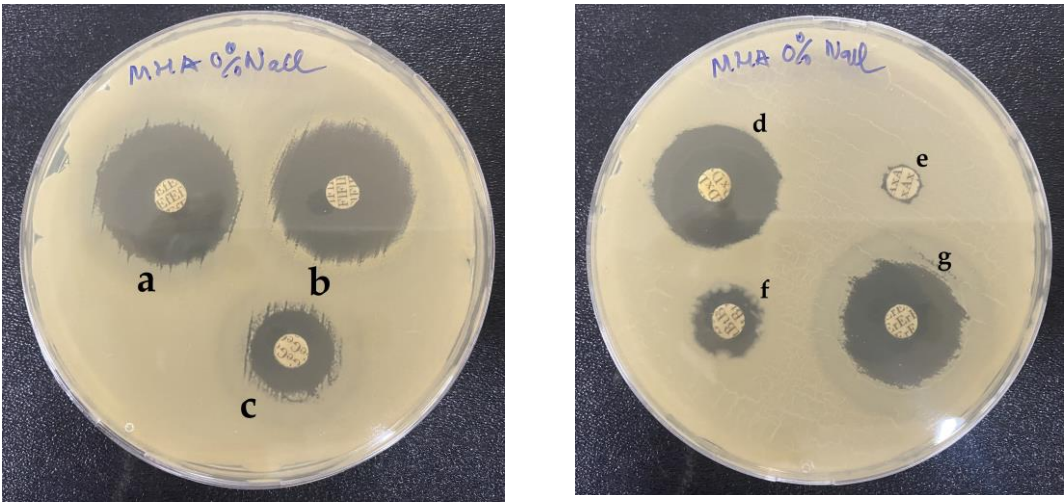
Tất cả các chủng *V. alginolyticus* phân lập được từ cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết trong nghiên cứu này khá đồng nhất về đặc điểm sinh lý, sinh hoá với các chủng vi khuẩn phân lập được trên cá Bóp (*Rachycentron canadum*) nuôi lồng tại Kiên Giang, [25] và cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) nuôi lồng tại Thành phố Huế [6]. Bên cạnh đó, các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* phân lập được trong nghiên cứu này lần lượt cũng có đặc điểm sinh hóa tương đồng với các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong nghiên cứu của Aly và cs., [23], và *V. vulnificus* theo báo cáo của Amaro và Biosca [24].



Hình 3. Kết quả định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật MALDI-ToF (A - *V. alginolyticus*, B - *V. parahaemolyticus*, C - *V. vulnificus*)

3.2 Kết quả nghiên cứu khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio*

Khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio spp.* phân lập được cho kết quả thể hiện ở Bảng 7 và Hình 4.



Hình 4. Vòng kháng khuẩn của kháng sinh đối với vi khuẩn *Vibrio spp.* phân lập

a: Fl = Florfenicol, b: Ef = Enrofloxacin, c: Ge = Gentamycin, d: Dx = Doxycycline, e: Ox = Oxacillin, f: Bt = Sulfamethoxazole/Trimethoprim, g: Er = Erythromycin

Bảng 7. Đường kính vòng kháng khuẩn của kháng sinh đối với vi khuẩn *Vibrio spp.* phân lập

STT	Kháng sinh	Đường kính tham chiếu (mm)		Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) (Mean ± SD)		
		S	R	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>
1	Oxacillin (Ox - 1µg)	≥13	≤10	7,5 ± 0,6	0	0
2	Gentamycin (Ge - 10µg)	≥15	≤12	19,8 ± 1,6	18,8 ± 0,6	20,8 ± 1,3
3	Erythromycin (Er - 15µg)	≥23	≤14	23,8 ± 1,0	21,4 ± 0,3	20,8 ± 0,4
4	Enrofloxacin (Ef - 5µg)	≥21	≤16	30,5 ± 2,6	29,5 ± 0,3	27,8 ± 0,6
5	Florfenicol (Fl - 30µg)	≥18	≤18	29,3 ± 1,7	26,4 ± 0,3	28,6 ± 0,3
6	Doxycycline (Dx - 30µg)	≥18	≤14	28,8 ± 2,6	32,7 ± 0,6	31,4 ± 0,3
7	Sulfamethoxazole/Trimethoprim (Bt, 23.75/1.25 µg)	≥16	≤10	8,5 ± 0,7	0	0

Ghi chú: S = Sensitive, đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn hoặc bằng giá trị của S thể hiện vi khuẩn nhạy với thuốc kháng sinh; R = Resistant, đường kính vòng kháng khuẩn nhỏ hơn hoặc bằng giá trị của R thể hiện vi khuẩn kháng kháng sinh. Đường kính tham chiếu dựa theo tiêu chuẩn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M45 Edition 3 [19].

Kết quả nghiên cứu khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết trong nghiên cứu này cho thấy, vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* nhạy với 5/7 loại kháng sinh thử nghiệm và kháng với 2/7 loại kháng sinh gồm Oxacillin và Sulfamethoxazole/Trimethoprim.

Điều này cho thấy việc sử dụng kháng sinh: Gentamycin, Erythromycin, Florfenicol, Doxycycline trong điều trị bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Vibrio* gây ra trên cá biển nuôi lồng vẫn đang có hiệu quả. Tuy nhiên, khuyến cáo người nuôi nên hạn chế sử dụng kháng sinh và hướng tới các giải pháp thay thế như sử dụng vaccine hoặc thảo dược để tránh ô nhiễm môi trường và đảm bảo an toàn thực phẩm thủy sản.

Nghiên cứu này cũng cho thấy dấu hiệu kháng thuốc của vi khuẩn *Vibrio* phân lập được từ vùng nuôi cá biển trong lồng tại vùng ven biển Thành phố Huế đối với Oxacillin và Sulfamethoxazole/Trimethoprim. Oxacillin thường chịu tác động của enzyme beta-lactamase sản sinh bởi các vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm [26], theo đó kháng sinh thuộc nhóm này thường có tác dụng mạnh trên vi khuẩn Gram dương và ít có tác dụng đối với vi khuẩn Gram âm. Hơn 90% các chủng vi khuẩn *Vibrio* kháng với kháng sinh nhóm Beta-lactams [27].

Gentamycin, Erythromycin thuộc những loại kháng sinh có phổ tác dụng mạnh trên các loài vi khuẩn gram âm, kết quả nghiên cứu cho thấy *Vibrio* phân lập từ cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết tại vùng ven biển Thành phố Huế vẫn đang nhạy với các loại kháng sinh này. Tuy nhiên các kháng sinh kể trên thường ít khi được sử dụng trong thực tiễn để điều trị các bệnh trên động vật thủy sản nói chung và bệnh trên cá biển nói riêng [16]. Kết quả nghiên cứu của Shahimi và cs., [28] khi tiến hành thử nghiệm kháng sinh trên 24 chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ Sò lông (*Anadara granosa*) cũng cho thấy *Vibrio* nhạy với Gentamycin, Erythromycin.

Trong khi đó, Enrofloxacin là loại kháng sinh có phổ tác dụng rộng, công dụng mạnh nhờ tính kháng khuẩn cao nhưng Enrofloxacin đã thuộc nhóm kháng sinh bị cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản tại Việt Nam từ năm 2012 [16] do sự lo ngại về những nguy cơ tồn dư kháng sinh gây hại tới môi trường, sức khỏe vật nuôi và sức khỏe con người. Một điều đáng quan ngại hiện nay khi thực tế kiểm tra các mẫu sản phẩm thủy sản vẫn thường xuyên bắt gặp sự hiện diện của loại kháng sinh này [14].

Florfenicol và Doxycycline thuộc những loại kháng sinh đang sử dụng phổ biến trong hoạt động nuôi trồng thủy sản tại Việt Nam cũng như trên thế giới. Kết quả nghiên cứu cho thấy những kháng sinh này vẫn đang có tác dụng tốt với vi khuẩn *Vibrio* khi số liệu đường kính vòng kháng khuẩn cho kết quả ở mức cao. Tuy vậy trong xu hướng toàn cầu đang hướng tới giảm thiểu tối đa việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản nói riêng và trong các ngành nghề chăn nuôi nói chung, việc sử dụng những kháng sinh thông dụng trong hoạt động nuôi cá biển cũng cần hết sức thận trọng để giảm thiểu tối đa những tác hại từ việc tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản cũng như ô nhiễm hóa học trong môi trường nước biển để đảm bảo tốt sức khỏe cho vật nuôi, sức khỏe con người và an toàn môi trường sinh thái [15].

4 Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*, 04 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và 05 chủng vi khuẩn *V. vulnificus* từ cá biển nuôi lồng bị bệnh xuất huyết tại Thành phố Huế, Việt Nam. Các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* phân lập nhạy với 5 loại kháng sinh gồm Gentamycin, Erythromycin, Florfenicol, Doxycycline, Enrofloxacin và kháng với 2 loại kháng sinh gồm Oxacillin và Sulfamethoxazole/Trimethoprim.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đề tài khoa học và công nghệ cấp Đại học Huế (DHH2024-02-183): Nghiên cứu phân lập, định danh và xác định mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh trên cá biển nuôi lồng tại Thừa Thiên Huế.

Tài liệu tham khảo

1. Mohamad, N., Amal, M.N.A., Yasin, I.S.M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N.S., Al-saari, N., Mino, S. and Sawabe, T. (2019), Vibriosis in cultured marine fishes: a review, *Aquaculture*, 512, 734289. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734289.
2. Deng, Y., Xu, L., Chen, H., Liu, S., Guo, Z., Cheng, C., Ma, H., Feng, J. (2020), Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *vibrio* species isolated from diseased marine fish in South China, *Scientific Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71288-0>.
3. Nguyễn Văn Quang, Lê Thị Phương Dung, Lương Thị Linh, Nguyễn Đắc Tú, Ngô Thị Hoàn, Vũ Quỳnh Anh (2022), Tổng quan hiện trạng ngành nuôi biển Việt Nam, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn: Khoa học công nghệ*, Tháng 12/2022, 51–65.
4. Đặng Thanh Long, Nguyễn Thái Hoàng, Hoàng Thị Kim Hồng, Lê Lý Thùy Trâm, Phạm Thị Hải Yến, Huỳnh Văn Chương (2019), Phân lập và tạo dòng gen *Thermolabile hemolysin* của vi khuẩn *Vibrio* từ cá hồng Mỹ *Sciaenops ocellatus* ở Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*, 128(1E), 5–14. <http://dx.doi.org/10.26459/hueuni-jns.v128i1E.5373>.
5. Hoàng Tấn Quảng, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Nguyễn Đức Huy, Trần Quang Khánh Vân, Phạm Thị Diễm Thi, Phạm Thị Hải Yến (2021), *Bệnh do vi khuẩn Vibrio spp. gây ra trên tôm, cá nuôi nước lợ ở Thừa Thiên Huế và biện pháp phòng trị*, Nxb. Đại học Huế.
6. Phạm Thị Hải Yến, Nguyễn Quang Linh, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Nguyễn Anh Hiếu (2021), Khả năng kháng khuẩn của cao chiết từ cây 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; DOI: 10.26459/hueunijtt.v130i2A.6570.

7. Phạm Thị Hải Yến (2022), Nghiên cứu vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) và thử nghiệm biện pháp phòng trị bệnh bằng Diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*), *Luận án tiến sĩ nuôi trồng thủy sản, Đại học Huế*, mã số 9620301.
8. Lulijwa, R., Rupia, E. J., Alfaro, A. C. (2020), Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers, *Review in Aquaculture*, 12, 640–663, <https://doi.org/10.1111/RAQ.12344>.
9. Buschmann, A. H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M. A., Henríquez, L. A., Ivanova, L., ... Cabello, F. C. (2012), *Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042724>.
10. Caputo, A., Bondad-Reantaso, M. G., Karunasagar, I., Hao, B., Gaunt, P., Verner-Jeffreys, D., ... Dorado-Garcia, A. (2023), Antimicrobial resistance in aquaculture: A global analysis of literature and national action plans, *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 568–578, <https://doi.org/10.1111/raq.12741>.
11. Schar, D., Klein, E. Y., Laxminarayan, R., Gilbert, M., Van Boeckel, T. P. (2020), Global trends in antimicrobial use in aquaculture, *Scientific reports*, 10(1), 21878. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>.
12. Thornber, K., Bashir, A., Ahmed, M. S., Bell, A., Trew, J., Hasan, M., Tyler, C. R. (2022), Antimicrobial resistance in aquaculture environments: unravelling the complexity and connectivity of the underlying societal drivers, *Environmental Science & Technology*, 56(21), 14891–14903. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00799>.
13. Nguyễn Trung Hiếu, Lê Thị Thùy Trang (2021), Hiện trạng sử dụng và tác hại của kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản, *Tạp chí khoa học công nghệ Việt Nam*, 12, 54–56.
14. Công văn số 7499/BNNT-TY ngày 09/11/2022 của Bộ NN&PTNT, *Việt Nam về việc Tăng cường công tác quản lý buôn bán, sử dụng thuốc thú y thủy sản trong nuôi trồng thủy sản*.
15. World Health Organization (2015), Global action plan on antimicrobial resistance, *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736>.
16. Thông tư 10/2016/TT-BNNPTNT ngày 01/6/2016 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, *Việt Nam*, Ban hành Danh mục thuốc thú y được phép lưu hành, cấm sử dụng ở Việt Nam, công bố mã hồ sơ đối với thuốc thú y nhập khẩu được phép lưu hành ở Việt Nam.
17. Uwizeyimana, J. D., Kim, D., Lee, H., Byun, J. H., & Yong, D. (2020), Determination of colistin resistance by simple disk diffusion test using modified Mueller-Hinton agar, *Annals of laboratory medicine*, 40(4), 306–311.
18. Lin, Y. R., Chiu, C. W., Chang, F. Y., & Lin, C. S. (2012), Characterization of a new phage, termed ϕ A318, which is specific for *Vibrio alginolyticus*, *Archives of virology*, 157, 917–926.
19. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute – M45 Edition 3 (2015).

20. Sagar Aryal (2022), *TCBS Agar- Composition, Principle, Preparation, Results, Uses*, Microbe Notes. <https://microbenotes.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar/#limitations-of-tcbs-agar>.
21. Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018), *Vibrio spp. infections. Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–19.
22. Buller, N.B. (2004) *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*, CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire.
23. Aly, S., M, Eisa, A.A, & ElBanna, N.I. (2020), Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* infection in gilthead seabream (*Sparus auratus*) cultured in Egypt, *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(1), 553–571.
24. Amaro, C., Biosca, E. G. (1996), *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1454–1457.
25. Nguyễn Bảo Trung và Từ Thanh Dung (2018), Nghiên cứu bệnh vi khuẩn trên cá bớp (*Rachycentron canadum*) nuôi lồng ở tỉnh Kiên Giang, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 54, 60–67.
26. Hussain, H. I., Aqib, A. I., Seleem, M. N., Shabbir, M. A., Hao, H., Iqbal, Z., ... & Li, K. (2021), Genetic basis of molecular mechanisms in β -lactam resistant gram-negative bacteria, *Microbial pathogenesis*, 158, 105040.
27. Hernández-Robles, M. F., Álvarez-Contreras, A. K., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Curiel-Quesada, E., Vázquez-Salinas, C., & Quiñones-Ramírez, E. I. (2016), Virulence factors and antimicrobial resistance in environmental strains of *Vibrio alginolyticus*, *International Microbiology*, 19(4), 191–198.
28. Shahimi, S., Elias, A., Abd. Mutalib, S., Salami, M., Fauzi, F., Mohd. Zaini, N. A., ... & Azuhairi, A. (2021), Antibiotic resistance and determination of resistant genes among cockle (*Anadara granosa*) isolates of *Vibrio alginolyticus*, *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 44002–44013.