

Antibiotics resistance in pathogenic bacteria isolated from water and sediment around the floating fish farms in the Nha Trang bay

Nguyen Kim Hanh*, Nguyen Trinh Duc Hieu, Nguyen Minh Hieu, Vo Hai Thi, Pham Thi Mien, Hoang Trung Du, Phan Minh Thu, Nguyen Huu Huan

Institute of Oceanography, VAST, Vietnam

*E-mail: nguyenkimhanh84@gmail.com

Received: 28 August 2020; Accepted: 26 October 2020

©2020 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

Abstract

To assess the impact of antibiotic use in aquaculture in Nha Trang bay, we conducted this study with the aim of assessing antibiotic resistance of opportunistic pathogenic bacteria isolated from water and sediment around shrimp/fish cages in the Nha Trang bay. 109 strains of *Vibrio*, *Salmonella*-*Shigella* and *Aeromonas* groups were isolated in the surrounding environment of farming areas in Dam Bay and Hon Mieu. Antimicrobial resistance test of these 109 strains showed that in the water environment in Dam Bay, TET (96.6%) and NIT (92.5%) were the two antibiotics with the highest rates of resistant bacteria while no bacteria were resistant to RIF. All 5 types of antibiotics had a statistically insignificant percentage of antibiotic-resistant bacteria in water samples at Hon Mieu, ranging from 33.3% to 68.9%. Also in the water environment, the rate of antibiotic-resistant bacteria in Dam Bay was not influenced by the distance to the cages (42.5–66.6%). Meanwhile, in Hon Mieu, the highest rate of resistant bacteria was observed at the distance of 200 m (100%) away from cages and the lowest rate at the distance of 100 m (20%). In the sediment environment around the cages, both the Dam Bay and Hon Mieu farming areas showed the highest rates of antibiotic-resistant bacteria against TET, NIF and RIF had the lowest rate of resistant bacteria. Among the total of 109 strains tested for antibiotic resistance, 2 strains labeled TCBS_HM200 m and SS_HM200 m were found to be resistant to all 5 tested antibiotics. These two strains were respectively identified as *Vibrio harveyi* and *Oceanimonas* sp.

Keywords: Antibiotic resistance, aquaculture, Nha Trang, pathogens, sediment, water.

Citation: Nguyen Kim Hanh, Nguyen Trinh Duc Hieu, Nguyen Minh Hieu, Vo Hai Thi, Phan Thi Mien, Hoang Trung Du, Phan Minh Thu, Nguyen Huu Huan, 2020. Antibiotics resistance in pathogenic bacteria isolated from water and sediment around the floating fish farms in the Nha Trang bay. *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 20(4A), 199–209.

Kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh cơ hội phân lập từ môi trường nước và trầm tích quanh khu vực nuôi trồng thủy hải sản tại vịnh Nha Trang

Nguyễn Kim Hạnh*, Nguyễn Trịnh Đức Hiệu, Nguyễn Minh Hiếu, Võ Hải Thi, Phạm Thị Miên, Hoàng Trung Du, Phan Minh Thọ, Nguyễn Hữu Huân

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam
*E-mail: nguyenkimhanh84@gmail.com

Nhận bài: 28-8-2020; Chấp nhận đăng: 26-10-2020

Tóm tắt

Đề đánh giá mức độ ảnh hưởng của việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản ở vịnh Nha Trang, đề tài này được tiến hành với mục tiêu kiểm nghiệm khả năng kháng kháng sinh của các vi khuẩn gây bệnh cơ hội phân lập từ nước và trầm tích quanh khu vực lồng nuôi tôm/cá. Kết quả kiểm nghiệm của 109 chủng vi khuẩn phân lập được cho thấy, ở trong môi trường nước ở Đầm Báy, kháng sinh Tetracyclin (TET) (96,6%) và Nifuroxazide (NIF) (92,5%) là 2 loại kháng sinh có tỷ lệ vi khuẩn kháng lại cao nhất trong khi không có vi khuẩn nào kháng lại Rifampicine (RIF). Cả 5 loại kháng sinh này đều có tỷ lệ vi khuẩn KKS không khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê trong khảo sát ở môi trường nước Hòn Miễu. Cũng ở môi trường nước, tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh ở Đầm Báy không bị chi phối bởi khoảng cách đối với lồng nuôi (42,5–66,6%). Trong khi đó, ở Hòn Miễu, ở khoảng cách 200 m (100%) cách từ lồng nuôi cho kết quả tỷ lệ kháng kháng sinh cao nhất và thấp nhất ở khoảng cách 100 m (20%). Trong môi trường trầm tích quanh lồng nuôi, ở cả 2 vùng nuôi Đầm Báy và Hòn Miễu đều cho kết quả tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh cao nhất đối với kháng sinh TET và NIT và kháng sinh RIF có tỷ lệ vi khuẩn kháng lại thấp nhất. Trong tổng 109 chủng được kiểm tra khả năng kháng kháng sinh, có 2 chủng ký hiệu TCBS_HM200 m và SS_HM200 m có khả năng kháng với cả 5 loại kháng sinh thử nghiệm. Hai chủng này được định danh lần lượt là *Vibrio harveyi* và *Oceanimonas* sp.

Từ khóa: Kháng kháng sinh, lồng nuôi tôm cá, Nha Trang, nước, trầm tích, vi khuẩn.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, hiện tượng kháng kháng sinh (KKS) của vi khuẩn ảnh hưởng đến khả năng điều trị các bệnh gây ra bởi vi khuẩn và đòi hỏi phải nỗ lực tìm kiếm các giải pháp chữa trị mới để ngăn chặn [1, 2]. Bên cạnh việc tìm kiếm các phương pháp chữa trị thay thế mới thì một vấn đề khác cũng cần phải được chú trọng hơn là việc điều tra nguồn gốc và hạn chế việc sử dụng các chất kháng sinh. Hiện nay, một lượng rất lớn các chất kháng sinh bị thải ra môi

trường từ nhiều nguồn khác nhau, ví dụ như chất thải từ các khu trồng trọt, nuôi trồng thủy hải sản hoặc từ nguồn thải bệnh viện, trung tâm y tế, các cơ sở chăn nuôi gia súc,... [3]. Những chất kháng sinh từ các hoạt động trên đang ngày càng được sử dụng phổ biến nhưng chính sách quản lý còn chưa được hiệu quả.

Nuôi trồng thủy hải sản là một trong những hoạt động góp phần vào việc thải một lượng lớn các chất kháng sinh ra môi trường nước xung quanh khu vực nuôi [4]. Việt Nam với lợi

thể tổng diện tích mặt nước lớn lên đến 1,7 triệu hecta và hơn 1 triệu hecta được dùng để nuôi trồng thủy sản đã đem lại giá trị kinh tế lớn và sản lượng thủy hải sản dồi dào cho tiêu dùng và xuất khẩu [5]. Tuy nhiên, việc xuất khẩu các sản phẩm thủy hải sản của Việt Nam đã từng bị ngưng trệ tại thị trường các nước EU do việc sử dụng quá nhiều chất kháng sinh trong nuôi trồng và vấn nạn ô nhiễm vùng biển quanh khu vực lồng bè [6]. Trong một công bố của nhóm nghiên cứu từ Đại học Stockholm, Thụy Điển đã có báo cáo về tình hình sử dụng các chất kháng sinh trong các lồng bè nuôi trồng thủy sản tại vịnh Nha Trang. Trong đó, kết quả của công bố này cho thấy một lượng lớn các chất kháng sinh khác nhau như: Tetracyclin (TET), Trimethoprim (TRI), Rifampicine (RIF), Nifuroxazide (NIF) và Colistin (COL) đã được dùng trong hoạt động nuôi trồng thủy hải sản ở vùng này. Cụ thể: trung bình khoản 555 g kháng sinh được dùng cho mỗi tấn cá sản xuất và 5.555 g kháng sinh cho mỗi tấn tôm hùm nuôi [7]. Một phần lớn các loại kháng sinh này lại bị thải ra ngoài vùng nước xung quanh, lắng đọng ở trầm tích xung quanh lồng nuôi; và gây ảnh hưởng đến sức khỏe của các hệ sinh thái lân cận (ví dụ như san hô, các loài cá tự nhiên, rong, tảo,...) thông qua việc thay đổi cấu trúc quần xã vi sinh vật sống cùng [7, 8]. Quan trọng hơn, sự hiện diện của kháng sinh có thể dẫn đến sự phát triển của hiện tượng kháng kháng sinh ở vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn gây bệnh mà cuối cùng có thể trực tiếp gây bệnh ở người hoặc lây lan qua các mầm bệnh gây bệnh ở người thông qua cơ chế chuyển gene ngang [9]. Trước những thực trạng về việc sử dụng các chất kháng sinh một cách thiếu kiểm soát và mức độ nguy hại có thể có đối với sức khỏe cộng đồng thì việc tìm hiểu và nghiên cứu về việc sử dụng các chất kháng sinh trong hoạt động nuôi trồng thủy sản và đánh giá mức độ kháng kháng sinh của một số vi khuẩn gây bệnh phân lập được từ các vùng nuôi là một việc làm cấp thiết. Các kết quả này có thể cung cấp dữ liệu khoa học cho việc tìm kiếm giải pháp quản lý và sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản một cách an toàn, hiệu quả và bền vững. Để trả lời cho một phần những câu hỏi trên, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng kháng kháng sinh của

các vi khuẩn gây bệnh cơ hội phân lập từ mẫu nước và trầm tích quanh khu vực lồng nuôi tôm/cá ở vịnh Nha Trang.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp thu mẫu

Mẫu được thu ở khu vực lồng nuôi cá tôm tại vịnh Nha Trang là Đầm Bảy (12°11,342' Vĩ độ Bắc, 109°18,933' Kinh độ Đông) và Hòn Miễu (12°11,048' Vĩ độ Bắc, 109°13,280' Kinh độ Đông), vào tháng 4/2019 (hình 1). Tại mỗi khu vực, mẫu nước biển được thu ở ba khoảng khác nhau trên mặt cách ngang tính từ lồng nuôi cá tôm, lần lượt là 0, 100, 200 m (hình 1B). Mẫu trầm tích được thu theo 6 khoảng cách tính từ lồng nuôi cá tôm, lần lượt là 0, 25, 50, 100, 150, 200 m (hình 1B). Mẫu được thu nhờ thợ lặn có khí tài (SCUBA). Các mẫu nước và trầm tích được chứa trong các ống falcon 15 ml đã khử trùng, giữ ở nhiệt độ lạnh 4°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm tại Viện Hải dương học trong vòng 2 tiếng kể từ thời điểm thu mẫu cho các phân tích tiếp theo.

Phân lập vi khuẩn từ mẫu nước và trầm tích

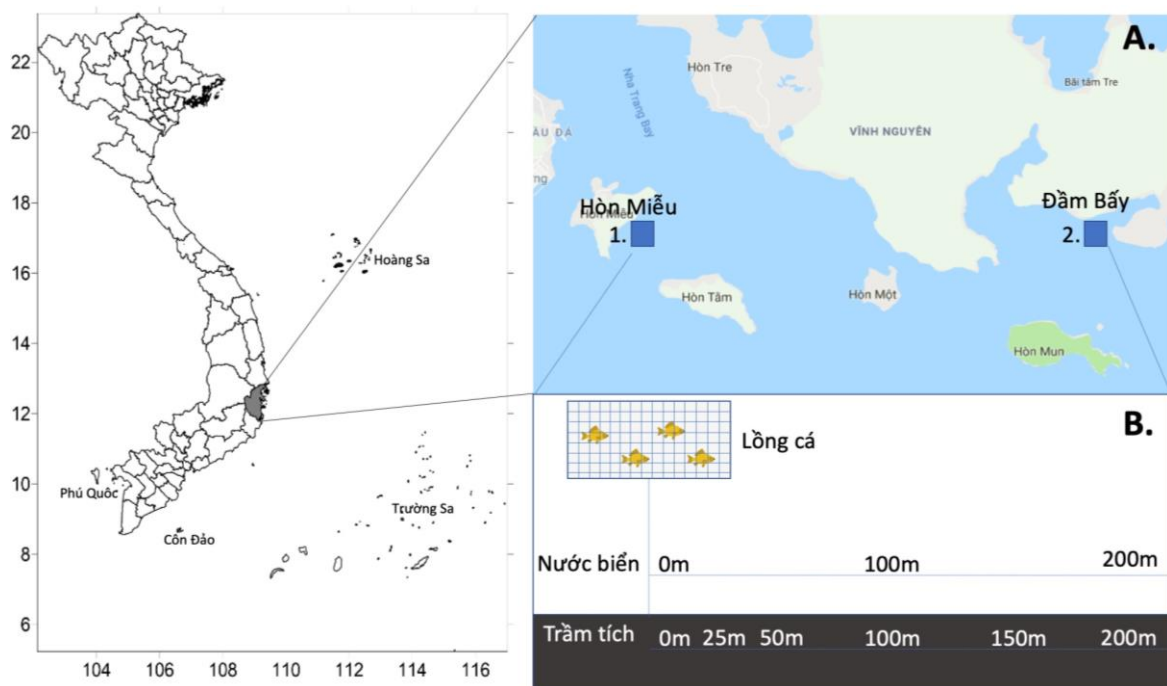
Vi khuẩn trong mẫu nước và trầm tích được tăng sinh trên môi trường marine broth (MB) với tỷ lệ 1:9. Sau 24 h chuẩn bị các ống nghiệm để pha loãng liên tiếp đến nồng độ 10^{-2} , 10^{-4} trong nước muối sinh lý. Các mẫu sau khi pha loãng được sử dụng để phân lập các nhóm vi khuẩn *Vibrio*, *Salmonella* - *Shigella*, *Aeromonas* bằng các môi trường đặc hiệu tương ứng sau: Thiosulfate Citrate Bile Salts (TCBS), *Salmonella*-*Shigella* (SS) và *Aeromonas* [10]. Tất cả các khuẩn lạc đều được nuôi cấy ở nhiệt độ phòng (27–28°C). Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch sau đó tiếp tục làm thuần bằng phương pháp ria ba chiều.

Phương pháp kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được kiểm tra khả năng kháng kháng sinh bằng phương pháp thử nghiệm trên đĩa 96 giếng [11]. Trước hết, các dung dịch gốc của chất kháng sinh cần kiểm tra sẽ được pha theo chỉ dẫn trên lọ kháng sinh với dung môi thích hợp. Các chất kháng sinh

được chọn kiểm tra bao gồm: TET, TRI, RIF, NIF và COL dựa trên nghiên cứu của Hedberg et al., [7]. Từ dung dịch gốc, pha loãng 1/2 cho đến nồng độ thấp nhất cần dùng bằng dung dịch đệm PBS. Các dung dịch kháng sinh pha loãng sẽ được bơm lên đĩa 96 giếng. Tiếp theo, 100 μ l dung dịch tăng sinh vi khuẩn (nồng độ 10^6 tế bào/ml, so sánh với độ đục chuẩn McFarland 0,5) sẽ được bơm vào mỗi giếng có chứa nồng độ kháng sinh khác nhau. Ủ đĩa ở nhiệt độ 28–30°C trong vòng 24 h. Sự phát triển vi khuẩn sẽ được đọc bằng máy

Microplate Reader EZ400 (Anh) và kết quả thể hiện bằng các giá trị mật độ quang (OD) ở bước sóng 650 nm. Trên đĩa 96 giếng sẽ có thêm các giếng đối chứng âm (chỉ chứa dung dịch marine broth không vi khuẩn, không kháng sinh) và đối chứng dương (chỉ có vi khuẩn trong dung dịch marine broth và không có kháng sinh). Nếu chủng vi khuẩn kiểm định phát triển được (có chỉ số OD tương đồng với chỉ số ở lô đối chứng dương) ở tất cả các nồng độ kháng sinh khác nhau là chủng vi khuẩn kháng kháng sinh.



Hình 1. Bản đồ thu mẫu: (A) Vị trí 2 khu vực thu mẫu tại Hòn Miếu và Đầm Báy, (B) Sơ đồ thu mẫu nước và trầm tích dưới lồng nuôi tôm cá [Nguồn: Bản đồ Việt Nam <https://thisisbinh.me/posts/vietnam-choropleth-map/>]

Phương pháp định danh vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

Các mẫu vi khuẩn có khả năng kháng cả 5 loại kháng sinh được gửi tới phòng xét nghiệm công ty TNHH DV và TM Nam Khoa để định danh. Cụ thể, phương pháp giải trình tự 16S rRNA được tiến hành để định danh các vi khuẩn gây bệnh có dấu hiệu kháng lại cả 5 loại kháng sinh thử nghiệm. Ban đầu, bộ gen vi khuẩn được tách chiết bằng bộ kit của QIAGEN và khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng phản

ứng PCR với cặp mồi 27F và 1495R có trình tự 27F: 5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'; 1495R: 5'CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA 3' [12]. Sản phẩm PCR được tinh chế và giải trình tự bằng phương pháp Sanger (Thực hiện bởi công ty TNHH Nam Khoa). Các trình tự nucleotide đọc được được so sánh với các trình tự của gen 16S rRNA của các chi tương ứng đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST 2.8.1.

Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Excel được sử dụng để tính toán các số liệu và lập bảng biểu và vẽ đồ thị. Kiểm định phi tham số Kruskal Wallis được sử dụng để so sánh sự khác biệt trong tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh giữa các kháng sinh khác nhau cũng như các khoảng cách thu mẫu khác nhau. Tiếp đến, kiểm định phi tham số Wilcoxon theo các cặp biến số được thực hiện khi có kết quả khác nhau về mặt ý nghĩa thống kê ở kiểm định Kruskal Wallis. Kết quả $P < 0,05$ được cho là có sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các biến số. Phần mềm Rstudio 1.2.1335 được sử dụng để tiến hành các phép kiểm định này.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập vi khuẩn gây bệnh cơ hội trong mẫu nước và trầm tích

Dựa vào sự khác biệt về hình thái, màu sắc và kích thước vi khuẩn, 109 chủng vi khuẩn khác nhau trong mẫu trầm tích và nước biển ở khu vực nuôi trồng Đầm Bậy và Hòn Miếu đã được phân lập và làm thuần. Trong đó, có 55 chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường TCBS, 36 chủng phân lập trên môi trường SS và 18 chủng phân lập trên môi trường Aeromonas agar. Trong tổng số 109 chủng vi khuẩn phân lập, có 53 chủng phân lập từ khu lồng nuôi ở Đầm Bậy và 56 chủng từ Hòn Miếu.

Kết quả thử nghiệm khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập

Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh trong môi trường nước

Kết quả thử nghiệm độ nhạy cảm vi khuẩn phân lập từ môi trường nước xung quanh lồng nuôi đối với 5 loại kháng sinh thử nghiệm được thể hiện ở bảng 1, hình 2, 3. Cụ thể, ở khu vực Đầm Bậy, kết quả cho thấy tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh đối với các kháng sinh khác nhau là khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$, $n = 6$). Trong đó, kháng sinh có tỷ lệ vi khuẩn kháng lại cao nhất là TET và NIF, với tỉ lệ lần lượt là $96,6\% \pm 0,0$ (Wilcoxon, $P < 0,05$; $n = 6$) và $92,5\% \pm 1,1$ (Wilcoxon, $P < 0,05$; $n = 6$). Tỷ lệ vi khuẩn kháng lại kháng sinh COL ($51,6\% \pm 0,1$) thấp hơn khoảng 1,8 lần so với TET và NIT (Wilcoxon, $P < 0,05$; $n = 6$). Tiếp theo là chỉ có khoảng 1/5 số vi khuẩn phân lập được tại đây có khả năng kháng lại kháng sinh TRI ($19,4\% \pm 0,1$). Không có chủng vi khuẩn nào phân lập trong mẫu nước ở Đầm Bậy có khả năng kháng lại kháng sinh RIF (bảng 1, hình 2).

Ngược lại với khu vực Đầm Bậy, tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh phân lập được ở trong môi trường nước quanh khu vực lồng nuôi Hòn Miếu không cho thấy sự khác nhau về mặt thống kê đối với các kháng sinh khác nhau (Kruskal-Wallis, $P > 0,05$; $n = 6$). Trong đó, tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh đối với 3 loại kháng sinh TET, COL và NIF là khá tương đồng nhau, lần lượt là $63,3\% \pm 0,0$; $62,2\% \pm 0,0$; $68,9\% \pm 0,0$. Tỷ lệ vi khuẩn kháng lại kháng TRI ($38,8\%$) và RIF ($33,3\%$) thấp hơn 3 loại kháng sinh trên, tuy nhiên sự khác nhau này không có ý nghĩa về mặt thống kê (bảng 1, hình 3).

Bảng 1. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh (%) trong môi trường nước ở Đầm Bậy và Hòn Miếu

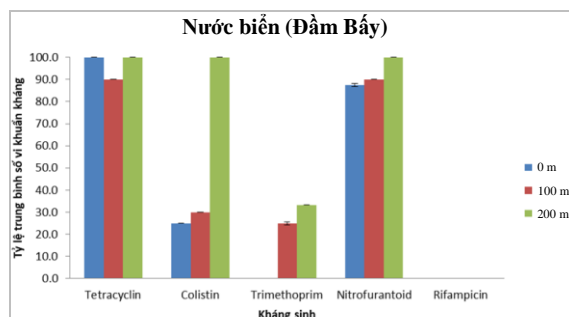
	TET	COL	TRI	NIT	RIF
Đầm Bậy	$96,6 \pm 0,0^a$	$51,6 \pm 0,1^{ab}$	$19,4 \pm 0,1^b$	$92,5 \pm 1,1^a$	$0,0 \pm 0,0^c$
Hòn Miếu	$63,3 \pm 0,0$	$62,2 \pm 0,0$	$38,8 \pm 0,1$	$68,9 \pm 0,0$	$33,3 \pm 0,0$

Ghi chú: Số liệu thể hiện giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 6$); các chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng 1 hàng biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

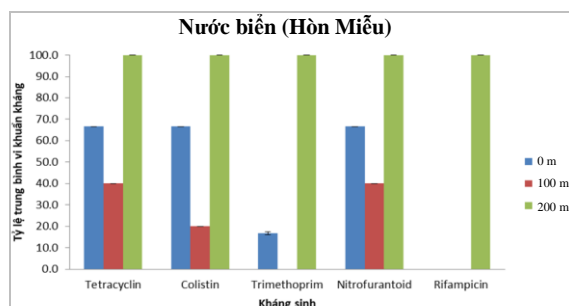
Kết quả tương tự được báo cáo trong nghiên cứu của Kim et al., [13] khi cho thấy toàn bộ chủng vi khuẩn phân lập (151 chủng) được trong nghiên cứu này đều cho kết quả kháng lại kháng sinh TET. Trong một nghiên cứu khác của Matyar et al., [14] kết quả cho thấy tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh với NIF là 60%. Theo báo cáo của Đặng Thị Hoàng

Oanh và nnk., [15] xác định định tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn phân lập từ các hệ thống nuôi thủy sản ở đồng bằng sông Cửu Long cho thấy tỷ lệ vi khuẩn kháng TET là 86%, của NIF là 57%. Kết quả của chúng tôi thu được ở đây cũng giống với kết quả nghiên cứu của Ferrini et al., [16] công bố các chủng *Vibrio* phân lập từ nước biển, các loài hải sản

có tỷ lệ kháng lại kháng sinh TET là cao (97%).



Hình 2. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh từ mẫu nước ở Đầm Báy ở các khoảng cách thu mẫu khác nhau tính từ lồng nuôi tôm/cá



Hình 3. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh từ nước ở Hòn Miếu ở các khoảng cách thu mẫu khác nhau tính từ lồng nuôi tôm/cá

Bảng 2. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh (%) trong nước ở 3 khoảng cách khác nhau từ lồng nuôi tôm/cá (0, 100 và 200 m) ở Đầm Báy và Hòn Miếu

	0 m	100 m	200 m
Đầm Báy	42,5 ± 0,1	47,0 ± 0,4	66,6 ± 0,1
Hòn Miếu	43,3 ± 0,1 ^a	20,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^b

Ghi chú: Số liệu thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 10); các chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng 1 hàng biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

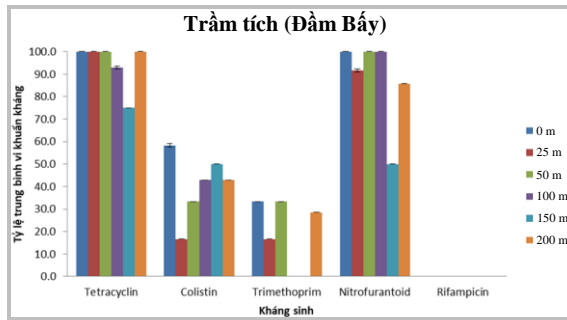
Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh trong trầm tích

Kết quả thử nghiệm độ nhạy cảm vi khuẩn phân lập từ trầm tích xung quanh lồng nuôi đối với 5 loại kháng sinh thử nghiệm được thể hiện ở hình 4, 5 và bảng 3. Cụ thể, ở khu vực Đầm Báy, kết quả cho thấy tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh đối với các kháng sinh khác nhau là khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$, $n = 10$). Trong đó, kháng sinh có tỷ lệ vi khuẩn kháng lại cao nhất là TET và

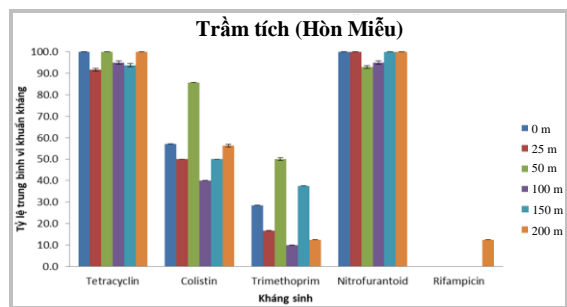
Kết quả so sánh tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh ở các khoảng cách thu mẫu khác nhau (0, 100 và 200 m) tính từ lồng nuôi tôm/cá thu tại 2 điểm Đầm Báy và Hòn Miếu cho thấy những xu hướng khác nhau ở 2 địa điểm thu mẫu này (bảng 2). Trong đó, ở Đầm Báy, tỷ lệ vi khuẩn kháng lại các kháng sinh thử nghiệm trong nghiên cứu không khác nhau về mặt thống kê giữa các khoảng cách thu mẫu (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$; $n = 10$). Cụ thể, tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh ở ngay lồng nuôi (0 m) ($42,5\% \pm 0,1$) tương đồng với tỷ lệ này ở khoảng cách cách đó 100 m ($47,0\% \pm 0,4$). Ở khoảng cách 200 m từ trung tâm lồng nuôi, tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh ($66,6\% \pm 0,1$) cao hơn ở trung tâm và khoảng cách 100 m, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Ngược lại, ở môi trường nước quanh Hòn Miếu, có sự khác biệt về mặt thống kê trong tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh ở các khoảng cách thu mẫu khác nhau (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$; $n = 10$). Trong đó, tất cả các chủng phân lập được ở vị trí 200 m đều có khả năng kháng ít nhất một loại kháng sinh ($100,0\% \pm 0,0$) (Wilcoxon, $P < 0,05$; $n = 10$). Tỷ lệ này cao gấp 2,3 và 5 lần so với số liệu thu được ở trung tâm lồng nuôi ($43,3\% \pm 0,1$) và ở khoảng cách 100 m từ lồng nuôi ($20,0\% \pm 0,0$).

NIF, với tỉ lệ lần lượt là $94,6\% \pm 0,1^b$ (Wilcoxon, $P < 0,05$; $n = 10$) và $86,7\% \pm 1,1^b$ (Wilcoxon, $P < 0,05$; $n = 10$). Tỷ lệ vi khuẩn kháng lại kháng sinh COL ($40,6\% \pm 0,1^a$) thấp hơn khoảng 2,3 lần so với TET và NIF (Wilcoxon, $P < 0,05$; $n = 10$). Tiếp theo là chỉ có khoảng 1/5 số vi khuẩn phân lập được tại đây có khả năng kháng lại kháng sinh TRI ($24,9\% \pm 0^d$). Không có chủng vi khuẩn nào phân lập trong mẫu trầm tích ở Đầm Báy có khả năng kháng lại kháng sinh RIF (hình 4, bảng 3).



Hình 4. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh từ mẫu trầm tích ở Đầm Báy thu tại các khoảng cách khác nhau



Hình 5. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh từ mẫu trầm tích ở Hòn Miếu thu tại các khoảng cách khác nhau

Tương tự với khu vực Đầm Báy, tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh phân lập được ở mẫu trầm tích quanh khu vực lồng nuôi Hòn Miếu

cũng cho thấy có sự khác nhau về mặt thống kê đối với các kháng sinh khác nhau (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$; $n = 10$). Trong đó, tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh đối với 2 loại kháng sinh TET, NIF lần lượt là $96,7\% \pm 0,3$; $99,1\% \pm 0,8$. Tỷ lệ vi khuẩn kháng lại kháng sinh COL thấp hơn khoảng 1,7 lần so với TET và NIF (Wilcoxon, $P < 0,05$; $n = 10$). Tỷ lệ vi khuẩn kháng lại kháng TRI ($30,4\% \pm 0,1$) và RIF ($2,1\% \pm 0,0^c$) (hình 5, bảng 3).

Theo Matyar et al., (2008) [14] vi khuẩn phân lập từ trầm tích có tỷ lệ kháng lại kháng sinh NIF là 60%, vi khuẩn phân lập từ mẫu tôm có tỷ lệ kháng lại kháng sinh NIF là 97,9%. Trong nghiên cứu của Neela et al., (2007) [17] về sự kháng thuốc của kháng sinh TET của các chủng *Vibrio* phân lập từ mẫu trầm tích và nước tỷ lệ vi khuẩn kháng là 64,8%. Đa số vi khuẩn nhạy cảm với kháng sinh RIF. Đã có nghiên cứu về tỷ lệ vi khuẩn nhạy cảm với RIF là 90% [18].

Với mẫu trầm tích ở Đầm Báy, các khoảng cách 0, 25, 50, 100, 150, 200 m có tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh giữa các khoảng cách tương đối là như nhau. Tương tự ở Hòn Miếu tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh giữa các khoảng cách tương đối cũng gần giống nhau. Điều này chứng tỏ khoảng cách không ảnh hưởng đến tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh (bảng 4 và hình 4, 5).

Bảng 3. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh (%) trong trầm tích ở Đầm Báy và Hòn Miếu

	TET	COL	TRI	NIF	RIF
Đầm Báy	$94,6 \pm 0,1^b$	$40,6 \pm 0,1^a$	$24,9 \pm 0^d$	$86,7 \pm 1,1^b$	$0,0 \pm 0,0^c$
Hòn Miếu	$96,7 \pm 0,3^b$	$56,5 \pm 0,1^a$	$30,4 \pm 0,1^d$	$99,1 \pm 0,8^b$	$2,1 \pm 0,0^c$

Ghi chú: Số liệu thể hiện giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 10$); các chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng 1 hàng biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Bảng 4. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh (%) trong trầm tích thu ở 6 khoảng cách khác nhau từ lồng nuôi tôm/cá (0, 25, 50, 100, 150 và 200 m) ở Đầm Báy và Hòn Miếu

	0 m	25 m	50 m	100 m	150 m	200 m
Đầm Báy	$58,3 \pm 0,4$	$53,3 \pm 0,1$	$53,3 \pm 0$	$47,1 \pm 0,1$	35 ± 0	$51,4 \pm 0$
Hòn Miếu	$57,1 \pm 0$	$51,6 \pm 0,1$	$65,7 \pm 0,4$	$48 \pm 0,2$	$56,2 \pm 0,4$	$56,2 \pm 0,4$

Ghi chú: Số liệu thể hiện giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 10$); các chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng 1 hàng biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Trong 5 loại kháng sinh thử nghiệm ở nghiên cứu này, RIF được ghi nhận là kháng

sinh có hoạt tính tốt nhất khi tỉ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh này là thấp nhất ở cả 2 địa

điểm thu mẫu: Đầm Báy (0%) và Hòn Miếu (33,3%). Nồng độ tối thiểu của kháng RIF kháng lại các vi khuẩn cao với nồng độ MIC = 4 µg/ml. Đối với kháng sinh RIF, các vi khuẩn trong nghiên cứu này hầu như không kháng lại. Khác với kết quả nghiên cứu của Đoàn Thị Minh Châu và nnk., [19] các tác giả đã công bố 24 chủng cho thấy các chủng *Aeromonas schubertii* kháng với RIF với tỷ lệ cao (100%). Theo một báo cáo khác về nồng độ ức chế tối thiểu của chủng *Mycobacterium tuberculosis* với kháng sinh RIF cho thấy nồng độ ức chế MIC = 0,2 ~ 0,5 µg/ml [20]. Với khoảng cách 200 m ở 2 địa điểm này đều có tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh cao (30–100%) trừ khoảng cách 200 m ở Đầm Báy vì vi khuẩn ở khoảng cách này lại nhạy cảm với RIF. Ở địa điểm Hòn Miếu, xuất hiện vi khuẩn kháng lại cả 5 loại kháng sinh thử nghiệm với tỷ lệ 100%.

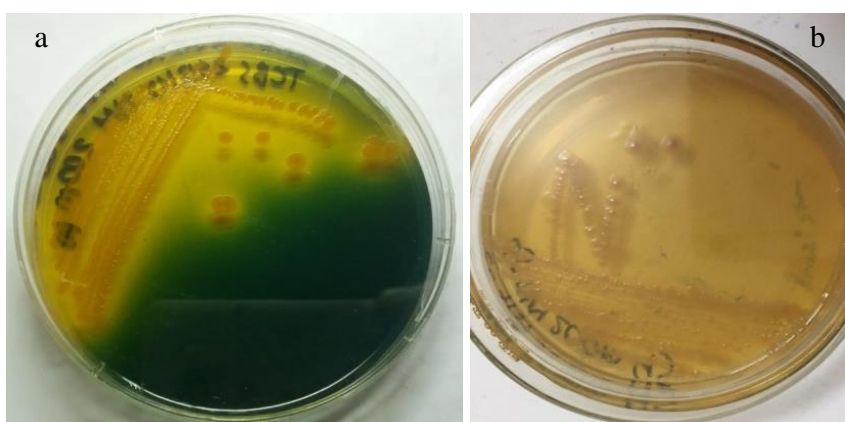
Kết quả định danh vi khuẩn kháng cả 5 loại kháng sinh

Trong 109 chủng vi khuẩn thử nghiệm, có 2 chủng vi khuẩn được tìm thấy kháng lại với cả

5 loại kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu này. Hai chủng này đều là các chủng được phân lập từ mẫu nước thu được ở khoảng cách 200 m so với khu vực lồng nuôi ở Hòn Miếu. Trong đó có 1 chủng được phân lập trên môi trường SS, kí hiệu là SS_HM200 m. Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc ghi nhận sau 24 h nuôi cấy như sau: Màu hồng nhạt, tâm nhô lên, đường kính 0,2–0,3 cm (hình 6a). Chủng còn lại được phân lập trên môi trường TCBS, kí hiệu là TCBS_HM200 m, khuẩn lạc màu vàng, có tâm, lồi, biến đổi môi trường từ xanh sang vàng, đường kính 0,2–0,3 cm (hình 6b).

Hai chủng vi khuẩn này sau đó được xác định hoạt tính sinh hoá bằng bộ kit API 20E và định danh dựa trên so sánh trình tự gen 16S rRNA bằng chương trình Blast.

Kết quả cho thấy cả 2 chủng đều có độ tương đồng lần lượt là 100% và 98% về trình tự gen 16S rRNA so với các chủng đã công bố trên ngân hàng gen. Trong đó, chủng TCBS_HM200 m được xác định là chủng *Vibrio harveyi* và chủng SS_HM200 m là chủng *Oceanmonas* sp. (bảng 5).



Hình 6. (a) Đĩa cấy khuẩn lạc của 2 chủng TCBS_HM200 m, (b) SS_HM200 m

Bảng 5. So sánh trình tự 16S rRNA của các vi khuẩn kháng 5 loại kháng sinh thử nghiệm với các trình tự tương đồng trên GenBank bằng công cụ BLAST

Chủng	Tổng điểm	Độ bao phủ	E-value	Max identities	Kết luận	Mã số đăng ký trên GenBank
TCBS_HM200 m	941	100%	0,0	100%	<i>Vibrio harveyi</i>	MF355398
SS_HM200 m	715	100%	0,0	97,83%	<i>Oceanmonas</i> sp.	NR_025027

Vibrio harveyi là vi khuẩn gram âm, hình que, kỵ khí tùy ý. Đây là chủng vi khuẩn gây nhiều mầm bệnh nguy hiểm, gây bệnh trên cá

động vật có xương sống và không xương sống [21]. Trên động vật có xương như cá mập Sandbar gây loét da [22], trên động vật không

xương sống như bào ngư Nhật Bản gây bệnh đốm trắng [23]. *Vibrio harveyi* còn gây bệnh viêm dạ dày [24], tổn thương mắt ở cá [25]. Theo nghiên cứu của Đặng Thị Hoàng Oanh và nnk., (2006) [15] phân lập được chủng *Vibrio harveyi* chỉ kháng được hai loại kháng sinh là TET và NIF với tỷ lệ 86% và 57%. Trước đó vào năm 1990, Baticados et al., [26] đã báo cáo về tỷ lệ nhạy của *Vibrio harveyi* với TET là 100% và NIF là 75%.

Oceanomonas sp. là vi khuẩn biển gram âm có khả năng sử dụng phenol làm nguồn carbon [27]. Chủng này chưa có ghi nhận về khả năng gây bệnh.

KẾT LUẬN

109 chủng vi khuẩn khác nhau trong mẫu trầm tích và nước biển ở khu vực nuôi trồng thủy sản ở Đầm Bậy và Hòn Miếu đã được phân lập và làm thuần. Trong đó, có 55 chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Vibrio*, 36 chủng phân lập *Salmonella-Shigella* và 18 chủng *Aeromonas*. Ở Đầm Bậy, 53 chủng vi khuẩn phân lập được và Hòn Miếu 56 chủng.

Trong môi trường nước quanh lồng nuôi ở Đầm Bậy, TET và NIF là hai loại kháng sinh có tỷ lệ vi khuẩn kháng lại cao (lần lượt là 96,6% và 92,5%) và không có vi khuẩn nào kháng lại kháng sinh RIF. Ở Hòn Miếu, ở khoảng cách 200 m từ lồng nuôi cho tỷ lệ vi khuẩn kháng sinh cao nhất và thấp nhất ở khoảng cách 100 m từ lồng nuôi.

Trong môi trường trầm tích dưới lồng nuôi ở cả Đầm Bậy và Hòn Miếu, TET và NIF đều là 2 loại kháng sinh có tỷ lệ vi khuẩn kháng lại cao nhất và RIF có tỷ lệ vi khuẩn kháng lại thấp nhất.

Tổng 109 chủng được kiểm tra khả năng kháng kháng sinh, có 2 chủng ký hiệu TCBS_HM200 m và SS_HM200 m có khả năng kháng với cả 5 loại kháng sinh thử nghiệm. Hai chủng này được định danh lần lượt là *Vibrio harveyi* và *Oceanimonas* sp.

Lời cảm ơn: Bài báo này là kết quả nghiên cứu của đề tài cơ sở 2019 (Viện Hàn Lâm Khoa học Và Công nghệ Việt Nam) của Phòng Sinh thái biển, Viện Hải dương học. Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành đến đoàn nghiên cứu thuộc đại học Stockholm, Thụy Điển đã hỗ trợ chúng tôi trong quá trình thu mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., ... and Laxminarayan, R., 2016. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 377–380. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>.
- [2] WHO (World Health Organization), 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Available at: World Health Organization, Geneva <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
- [3] Gothwal, R., and Shashidhar, T., 2015. Antibiotic pollution in the environment: a review. *Clean–Soil, Air, Water*, 43(4), 479–489. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>.
- [4] Grenni, P., Ancona, V., and Caracciolo, A. B., 2018. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>.
- [5] FAO, 2016. The state of world fisheries and aquaculture.
- [6] Gräslund, S., and Bengtsson, B. E., 2001. Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment—a review. *Science of the Total Environment*, 280(1–3), 93–131. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00818-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00818-X).
- [7] Hedberg, N., Stenson, I., Pettersson, M. N., Warshan, D., Nguyen-Kim, H., Tedengren, M., and Kautsky, N., 2018. Antibiotic use in Vietnamese fish and lobster sea cage farms; implications for coral reefs and human health. *Aquaculture*, 495, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.005>.
- [8] Lalumera, G. M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., and Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*, 54(5), 661–668. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.08.001>.

- [9] Rico, A., Jacobs, R., Van den Brink, P. J., and Tello, A., 2017. A probabilistic approach to assess antibiotic resistance development risks in environmental compartments and its application to an intensive aquaculture production scenario. *Environmental Pollution*, 231, 918–928. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.079>.
- [10] Pfeffer, C. S., Hite, M. F., and Oliver, J. D., 2003. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern North Carolina. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3526–3531. Doi: 10.1128/AEM.69.6.3526-3531.2003.
- [11] Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, S. K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [12] Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697–703. Doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- [13] Kim, S. R., Nonaka, L., and Suzuki, S., 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*, 237(1), 147–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09690.x>.
- [14] Matyar, F., Kaya, A., and Dinçer, S., 2008. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun bay, Turkey. *Science of the Total Environment*, 407(1), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.014>.
- [15] Dang Thi Hoang Oanh, Nguyen Thanh Phuong, Temdoug Somsiri, Supralee Chinabut, Fatimah Yussoff, Mohamed Shariff, Kerry Bartie, Geert Huys, Mauro Giacomini, Stefania Berton, Jean Swings and Alan Teale, 2005. Determination of antibiotic resistance of bacteria isolated from aquaculture systems in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Science*, (1), 136–144. (in Vietnamese).
- [16] Ferrini, A. M., Mannoni, V., Suffredini, E., Cozzi, L., and Croci, L., 2008. Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. *Food Analytical Methods*, 1(3), 164–170. Doi: 10.1007/s12161-007-9011-2.
- [17] Neela, F. A., Nonaka, L., and Suzuki, S., 2007. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater. *The Journal of Microbiology*, 45(1), 64–68.
- [18] Nguyen Bao Trung and Tu Thanh Dung, 2018. Research of bacterial diseases on catfish (*Rachicentron canadum*) in fish cages in Kien Giang province, Vietnam. *Can Tho University Journal of Science*, 54(2), 64–67. (in Vietnamese).
- [19] Doan Thi Minh Chau, Luu Hong Mai and Tu Thanh Dung, 2018. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogen causing internal white spot disease in snakehead fish (*Channa striata*) in Tra Vinh province. *Can Tho University Journal of Science*, 54(2), 108–115.
- [20] Van Ingen, J., Aarnoutse, R., De Vries, G., Boeree, M. J., and Van Soolingen, D., 2011. Low-level rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains raise a new therapeutic challenge. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 15(7), 990–992. <https://doi.org/10.5588/ijtld.10.0127>.
- [21] Austin, B., and Zhang, X. H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 119–124. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>.
- [22] Bertone, S., Gili, C., Moizo, A., and Calegari, L., 1996. *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *Journal of Fish Diseases*, 19(6), 429–434. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1996.d01-94.x>.
- [23] Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T., and Wakabayashi, H., 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in

- Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathology*, 33(5), 495–502. <https://doi.org/10.3147/jsfp.33.495>.
- [24] Lee, K. K., Liu, P. C., and Chuang, W. H., 2002. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology*, 4(3), 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0018-9>.
- [25] Ishimaru, K., and Muroga, K., 1997. Taxonomical re-examination of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathology*, 32(1), 59–64. <https://doi.org/10.3147/jsfp.32.59>.
- [26] Baticados, M. C. L., Lavilla-Pitogo, C. R., Cruz-Lacierda, E. R., De La Pena, L. D., and Sunaz, N. A., 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org*, 9(2), 133–139.
- [27] Brown, G. R., Sutcliffe, I. C., and Cummings, S. P., 2003. Combined solvent and water activity stresses on turgor regulation and membrane adaptation in *Oceanimonas baumannii* ATCC 700832. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(3), 275–283. <https://doi.org/10.1023/A:1023348928376>.