

## KHẢ NĂNG KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN BIỂN TẠI HÒN MỘT VỊNH NHA TRANG

Phạm Thị Miên\*, Đào Việt Hà, Nguyễn Kim Hạnh

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

Ngày nhận bài: 6-9-2016

**TÓM TẮT:** Hiện tượng vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh đang là vấn đề quan tâm của toàn thế giới, khi ngày càng xuất hiện nhiều vi khuẩn gây bệnh ở người có khả năng kháng lại với nhiều thuốc kháng sinh. Đánh giá vi khuẩn biển ở những vùng nuôi trồng có khả năng kháng thuốc hay không thực sự là cần thiết, để kịp thời đưa ra những cách quản lý việc sử dụng thuốc kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản. Sự kháng thuốc của vi khuẩn phân lập tại vùng nuôi thủy sản tại Hòn Một, vịnh Nha Trang được thực hiện với 5 loại kháng sinh chloramphenicol, tetracycline, cefazolin, streptomycin và gentamicin trên môi trường Mueller Hinton Agar. Tổng số 18 chủng phân lập từ mẫu trầm tích có 14 chủng Gram dương, 4 chủng Gram âm đều nhạy cảm với các loại kháng sinh. Chủng KH1 ít nhạy cảm với tetracycline nhất với bán kính vòng vô khuẩn trung bình là 4,0 mm, chủng T1 ít nhạy cảm với streptomycin nhất với vòng vô khuẩn trung bình là 4,2 mm. Chủng KH6 và chủng T7 kháng lại cefazolin với bán kính vòng vô khuẩn trung bình tương ứng là 0 mm và 2 mm. Chủng KH6 được xác định là *Bacillus* sp.. Vi khuẩn kháng thuốc đã xuất hiện ở vùng nuôi trồng và du lịch tại Hòn Một, rất có thể có nhiều vi khuẩn đã kháng thuốc thậm chí kháng đa thuốc đã xuất hiện ngoài môi trường tự nhiên. Đây cũng là một vấn đề cần nghiên cứu sâu hơn để có thể đưa ra những giải pháp nhằm góp phần hạn chế vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh đang ngày một gia tăng như hiện nay.

**Từ khóa:** Vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh, Hòn Một, Nha Trang.

### MỞ ĐẦU

Vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh đang là vấn đề được toàn thế giới quan tâm. Đặc biệt ở những nước đang phát triển trong đó có Việt Nam, việc sử dụng kháng sinh sai mục đích, không đúng cách hay lạm dụng thuốc kháng sinh là vấn đề khó tránh khỏi. Tất cả những vấn đề trên lại là nguyên nhân chủ yếu dẫn tới hiện tượng kháng thuốc kháng sinh ngày một gia tăng ở vi khuẩn [1]. Vi khuẩn mang tính kháng thuốc có thể truyền các đặc tính này cho những vi khuẩn cùng loài hoặc không cùng loài, chẳng hạn như vi khuẩn có nguồn gốc động vật truyền tính kháng thuốc cho vi khuẩn có nguồn gốc ở người [2]. Hậu quả là thuốc kháng sinh đang dần

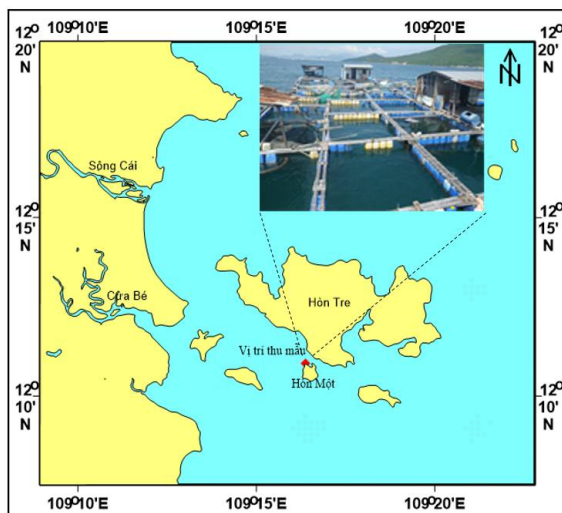
trở nên mất tác dụng, do đó ngay cả việc điều trị những bệnh đơn giản thông thường sẽ trở thành khó khăn và tốn kém hơn rất nhiều [3].

Thực sự, gen kháng thuốc kháng sinh sulfonamid và những vi khuẩn kháng thuốc đã xuất hiện ngoài môi trường nuôi tôm và các trang trại chăn nuôi ở các tỉnh Hà Tây, Hà Nội và Hải Phòng [4, 5]. Tại các tỉnh Đồng Tháp, An Giang, Cần Thơ, Vĩnh Long và Bến Tre đã tìm thấy sự kháng thuốc chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, gentamicin,... ở những vi khuẩn *Pseudomonas* và *Aeromonas* thường gây bệnh cho cá da trơn xuất khẩu [6]. Hòn Một nằm về phía đông nam của thành phố Nha Trang, cách bờ chừng 9 km, là đảo nhỏ nhất

trong vịnh Nha Trang, với diện tích dưới 1 km<sup>2</sup>. Tại đây, nghề nuôi hải sản chủ yếu là nuôi tôm hùm đang diễn ra bên cạnh các hoạt động du lịch. Hoạt động nuôi trồng thủy sản không thể tránh khỏi việc dùng đến chất kháng sinh để trị bệnh cho vật nuôi, nhất là ở những cơ sở nuôi nhỏ lẻ, không nuôi theo một quy trình nghiêm ngặt và không có sự kiểm soát chặt chẽ về quy cách sử dụng kháng sinh cho nuôi trồng, do đó có thể thấy được chất kháng sinh đã xâm nhập môi trường biển [7]. Đồng thời, Hòn Một còn là một điểm đến du lịch hấp dẫn trong vịnh Nha Trang, chính vì thế những hoạt động do con người tác động đến vùng này là khó tránh khỏi. Hệ vi sinh vật trên mẫu trầm tích là một trong những chỉ thị sinh học cho biết tác động của hoạt động con người hay các chất ô nhiễm ảnh hưởng đến môi trường biển. Cho đến nay chưa có một công trình nghiên cứu khoa học về vấn đề này tại trầm tích ở khu vực nuôi thủy sản, vịnh Nha Trang. Với mục tiêu tìm hiểu vi khuẩn biển trên mẫu trầm tích thu tại Hòn Một nhạy cảm với kháng sinh hay đã kháng lại thuốc kháng sinh, từ đó có thể đưa ra những khuyến cáo nhằm bảo vệ cộng đồng, đồng thời nhằm bảo vệ hệ sinh thái biển tránh những tác động tiêu cực của con người.

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Địa điểm và thời gian thu mẫu



Hình 1. Bản đồ vị trí lấy mẫu

Mẫu trầm tích được thu qua thợ lặn có khí tài (SCUBA) ở độ sâu 5 m tại vị trí có tọa độ

*Khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn biển...*

109°16'22,9" kinh độ đông, 12°10'54,8" vĩ độ bắc, tại Hòn Một, vịnh Nha Trang (hình 1) ngày 23/2/2016. Nhiệt độ nước biển tại thời điểm thu mẫu là 28°C±1, độ mặn nước biển là 31‰. Mẫu trầm tích được thu trong ống ly tâm 50 ml vô trùng, sau đó được bảo quản trong bình đá và vận chuyển về phòng thí nghiệm Sinh thái biển, Viện Hải dương học để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

### Phương pháp nuôi cấy và kiểm tra khả năng kháng kháng sinh

Vi khuẩn từ mẫu trầm tích Hòn Một được phân lập đến thuần trên môi trường Nutrient agar (NA-Himedia, Ấn độ). Hình dạng khuẩn lạc và các đặc điểm hình thái được ghi chú, xác định Gram dựa trên kết quả phản ứng KOH [8]. Nhuộm đơn tế bào vi khuẩn, soi dưới kính hiển quang học (LEICA-DMLB), hình ảnh tế bào được chụp và xử lý bằng phần mềm chụp ảnh kỹ thuật số (Olympus-DP71). Vi khuẩn được kiểm tra khả năng di động, phản ứng catalase, oxidase và đối chiếu kết quả với bảng phân loại của Bergey [9]. Môi trường chuẩn Mueller Hinton Agar (MHA-Himedia, Ấn độ) được dùng để thực hiện khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn, dựa theo nguyên lý phương pháp khuếch tán thạch của Bauer [10], chuẩn bị môi trường canh thang tăng sinh vi khuẩn được thực hiện theo Phạm Thị Miên và nnk., [11], thao tác đặt đĩa (disc) có kháng sinh và đọc kết quả theo hướng dẫn kèm theo của nhà sản xuất (BioRad - Pháp). Thí nghiệm kháng kháng sinh được tiến hành với 5 loại kháng sinh gồm chloramphenicol (30 µg), tetracycline (30 µg), cefazolin (30 µg), streptomycin (300 µg) và gentamicin (10 µg). Mỗi loại kháng sinh được thực hiện với 3 đĩa (n = 3), vòng kháng khuẩn được tính bằng giá trị trung bình xuất hiện trên 3 đĩa. Những chủng có bán kính vòng vô khuẩn ≤ 2 mm, hoặc không xuất hiện vòng vô khuẩn ở cả 3 đĩa được làm thí nghiệm lặp lại, với đối chứng dương là chủng vi khuẩn (trong nghiên cứu này) có vòng kháng khuẩn ở cả ba đĩa, và đối chứng âm là không đặt các đĩa có kháng sinh. Độ nhạy kháng sinh được tính bằng bán kính vòng kháng khuẩn trung bình (mm). Những chủng vi khuẩn không xuất hiện vô khuẩn tại các vị trí đặt đĩa kháng sinh thì chủng vi khuẩn đó được coi là kháng lại kháng sinh được thử nghiệm.

### Phương pháp xử lý số liệu

Toàn bộ số liệu được xử lý trên phần mềm thống kê R [12], bản đồ trạm vị thu mẫu được xây dựng trên phần mềm Surfer và MapInfo.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

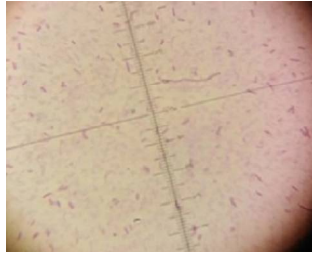
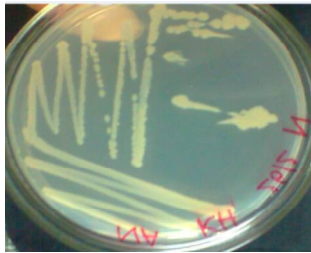
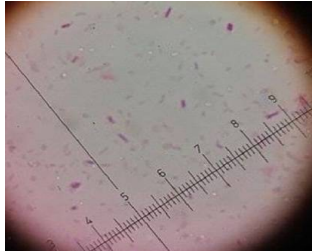
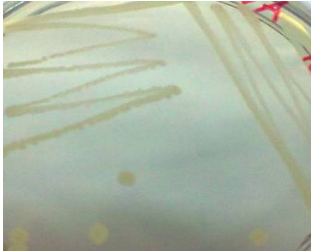
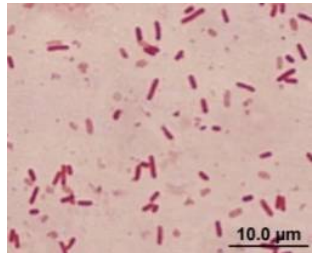

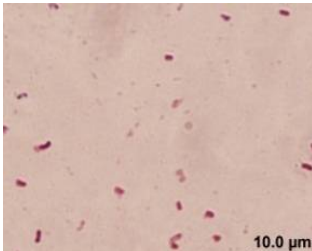
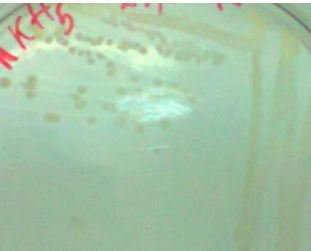
#### Đặc điểm hình thái, kích thước của các chủng vi khuẩn biển phân lập được

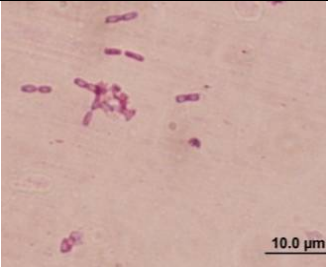

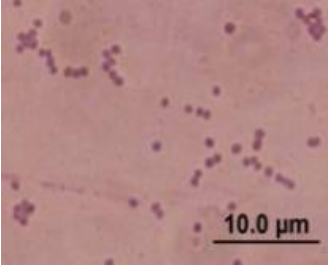
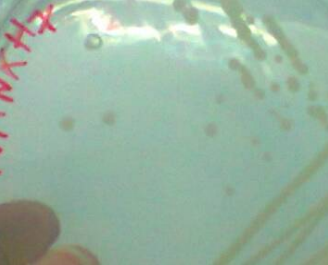
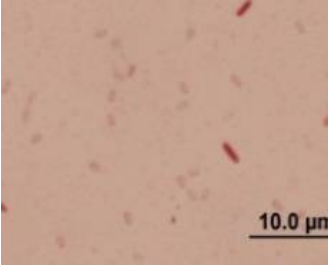

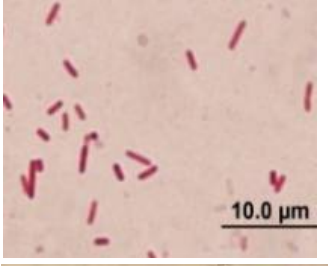


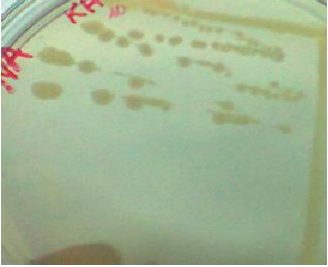
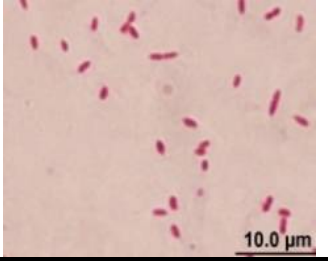
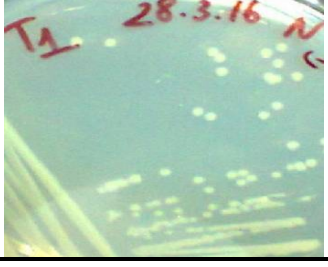
Từ các kết quả cấy trên các nồng độ pha loãng, chọn 2 nồng độ  $10^{-3}$  và  $10^{-4}$  để tính tổng số vi sinh vật hiếu khí. Kết quả cho thấy số lượng khuẩn lạc mọc trên 2 đĩa của nồng độ  $10^{-3}$  lần lượt là 247, 103 khuẩn lạc và  $10^{-4}$  là



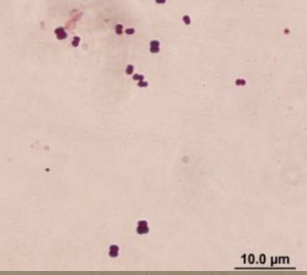

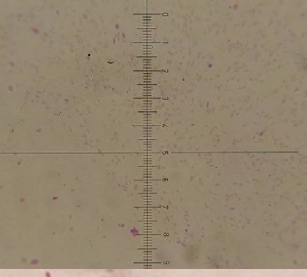







238, 78 khuẩn lạc, do đó tổng số vi sinh vật hiếu khí trong 1 g mẫu trầm tích là  $1,5 \times 10^6$  Cfug.

Từ các nồng độ pha loãng, chọn những khuẩn lạc có hình dạng, kích thước khác nhau để phân lập, giữ giống và dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Tổng số 18 chủng vi khuẩn với hình dạng, kích thước khác nhau được phân lập và ký hiệu là KH1, KH2, KH4, KH5, KH6, KH7, KH8, KH9, KH10, T1, T3, T4, T7, T9, T10, T11, T12 và T14. Đặc điểm hình dạng, kích thước, màu sắc khuẩn lạc (sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường NA) và các đặc điểm tế bào được trình bày chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Hình dạng, kích thước tế bào và khuẩn lạc

STT	Mô tả	Hình ảnh tế bào	Hình ảnh khuẩn lạc
KH1 (+)	Tế bào hình que, có bào tử. Kt: $0,8 \times 2,5 \mu\text{m}$ . Khuẩn lạc tròn, màu trắng, mép răng cưa, VTĐT. Đk: 2 - 3 mm.		
KH2 (+)	Tế bào hình que, có bào tử, đậm màu ở 2 đầu. Kt: $0,5 \times 2,5 \mu\text{m}$ . Khuẩn lạc tròn dẹt, gọn, VTĐT. Đk: 2 - 3 mm.		
KH4 (+)	Tế bào hình que, hai đầu đậm màu. Kt: $0,8 \times 2,0 \mu\text{m}$ . Khuẩn lạc tròn, màu kem, lồi, bề mặt trơn. Đk: 2 - 3 mm.		
KH5 (+)	Tế bào hình que, có bào tử. Kt: $0,6 \times 2,0 \mu\text{m}$ . Khuẩn lạc tròn, trắng, bề mặt lồi và khô giống giọt nến. Đk: 1,0 - 1,5 mm.		

KH6 (+)	<p>Tế bào hình que, bào tử.                      Kt: 0,8 x 2,5 <math>\mu</math>m.                      Khuẩn lạc dẹt, mép loang, tròn, bề mặt khô.                      Đk: 2 - 4 mm.</p>		
KH7 (+)	<p>Tế bào hình cầu, đơn, đôi, bốn.                      Kt: 0,6 - 0,8 <math>\mu</math>m.                      Khuẩn lạc tròn, bóng, bề mặt lồi.                      Đk: 1 - 2 mm.</p>		
KH8 (+)	<p>Tế bào hình que, tế bào đầy đặn.                      Kt: 0,5 x 2,0 <math>\mu</math>m.                      Khuẩn lạc tròn, VTĐT, bóng ướt.                      Đk: 2 - 3 mm.</p>		
KH9 (+)	<p>Tế bào hình que.                      Kt: 0,6 x 2,0 <math>\mu</math>m.                      Khuẩn lạc tròn, dẹt, trắng, mép có rìa xung quanh.                      Đk: 1,5 - 3,0 mm.</p>		
KH10 (+)	<p>Tế bào hình que.                      Kt: 0,8 x 2,5 <math>\mu</math>m.                      Khuẩn lạc tròn, mép răng cưa, VTĐT, bóng ướt ở ngoài rìa.                      Đk: 2 - 3 mm.</p>		
T1 (-)	<p>Tế bào que ngắn, elip.                      Kt: 0,8 x 1,6 <math>\mu</math>m.                      Khuẩn lạc tròn, màu trắng kem, VTĐT, gợn, bóng ướt, rìa bóng trong.                      Đk: 2 - 3 mm.</p>		

T3 (-)	<p>Tế bào hình que. Kt: 0,2 x 1,5 <math>\mu</math>m. Khuẩn lạc tròn, trắng kem, bóng ướt, rìa bóng trong. Đk: 1,5 - 3,0 mm.</p>		
T4 (+)	<p>Tế bào hình cầu, đôi, bốn. Kt: 1,0 <math>\mu</math>m. Khuẩn lạc tròn, màu vàng chanh, bề mặt lồi và bóng. Đk: 2 - 3 mm.</p>		
T7 (-)	<p>Tế bào hình que, nhỏ, mảnh. Kt: 0,5 x 1,0 <math>\mu</math>m. Khuẩn lạc tròn, trắng sữa, bóng, ướt, nhầy. Đk: 2 - 3 mm.</p>		
T9 (-)	<p>Tế bào hình que, tạo thành chuỗi. Kt: 0,8 x 1,6 <math>\mu</math>m. Khuẩn lạc tròn, màu trắng kem, bóng trong, VTĐT. Đk: 1 - 2 mm.</p>		
T10 (+)	<p>Tế bào hình que, mảnh, thon. Kt: 0,6 x 2,5 <math>\mu</math>m. Khuẩn lạc tròn, vàng nâu, trơn bóng. Đk: 3 - 4 mm.</p>		
T11 (+)	<p>Hình que thon, dài, chuỗi. Kt: 0,8 x 2,9 <math>\mu</math>m. Khuẩn lạc tròn, màu trắng VTĐT, bóng, mép gọn. Đk: 3 - 4 mm.</p>		



*Ghi chú:* VTĐT- Vòng tròn đồng tâm, Kt- kích thước tế bào, Đk- đường kính khuẩn lạc, (+) Gram dương, (-) Gram âm.

Qua bảng 1 cho thấy 18 chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu trầm tích có sự đa dạng về hình dạng, màu sắc khuẩn lạc, cũng như kích thước tế bào. Tổng số 18 chủng vi khuẩn phân lập có 14 chủng vi khuẩn Gram dương chiếm 17,8% đa số là hình que. Chủng KH6 là vi khuẩn Gram dương hiếu khí, có khả năng di động, khuẩn lạc có màu trắng, mép loang ra xung quanh, bề mặt khuẩn lạc phẳng trơn láng, tế bào hình que, kích thước tế bào khoảng 0,8 x 2,5  $\mu\text{m}$ , có bào tử (bảng 1). Theo hệ thống phân loại hình thái của Bergey (1984) thì chủng KH6 được xác định là *Bacillus* sp.

### Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn

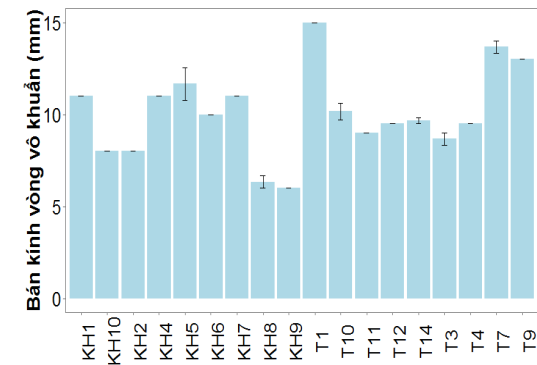
Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn đối với 5 loại kháng sinh chloramphenicol, tetracycline, cefazolin, streptomycin và gentamicin lần lượt được thể hiện trên hình 2A, 2B, 2C, 2D, 2E và 2F. Chủng vi khuẩn Gram âm T1 nhạy cảm nhất với 15 mm (hình 2A). Đối với chloramphenicol, chủng KH9 có vòng vô khuẩn nhỏ nhất (6 mm) so với các chủng còn lại. Trong khi chủng KH1 ít nhạy cảm với kháng sinh tetracycline nhất với bán kính vòng vô khuẩn là 4 mm (hình 2B). Theo CLSI [13], đại diện cho vi khuẩn Gram dương - *Staphylococcus* spp. - được xác định là kháng

chloramphenicol (30  $\mu\text{g}$ ) khi đường kính vòng vô khuẩn  $D \leq 12$  mm và kháng tetracycline (30  $\mu\text{g}$ ) khi  $D \leq 14$  mm. Do đó cho thấy vi khuẩn Gram dương KH9 có thể đã kháng chloramphenicol và vi khuẩn Gram dương KH1 đã kháng lại tetracycline. Gen kháng thuốc kháng sinh đã được phát hiện ở 6 trang trại nuôi thủy sản thuộc tỉnh Thiên Tân (Tianjin) phía đông bắc Trung Quốc. Trong đó có đến 57,14% vi khuẩn kháng tetracycline đa số thuộc chi *Bacillus*. Ngoài ra các chủng *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* còn phát hiện cả gen kháng tetracycline và sulfadiazine. Việc tìm ra 6 gen (tetM, tetO, tetT, tetW, sul1 và sul2) trong *B. cereus* cho thấy chủng này đã thể hiện sự kháng đa thuốc [14]. Gen kháng thuốc, nhiều nhất là kháng tetracycline cũng đã được phát hiện tại những vùng nuôi trồng hải sản ở Úc [15].

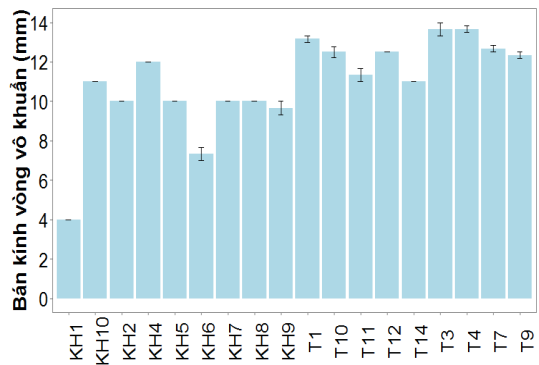
Đối với cefazolin, trừ KH6 (0 mm) và T6 (2,0 mm), các chủng được thử nghiệm đều có xu hướng nhạy cảm với vòng vô khuẩn nhỏ nhất là chủng T10 (9,5 mm) và lớn nhất là KH1 (14,5 mm). Chủng KH6 không xuất hiện vòng vô khuẩn xung quanh các đĩa kháng sinh cefazolin ở cả hai lần thí nghiệm mỗi lần với 3 đĩa (hình 2C, 2D). Chủng KH6 là vi khuẩn *Bacillus* sp. và về bản chất tự nhiên thì các chủng *Bacillus* chưa được phát hiện là có đặc tính kháng kháng sinh cefazolin, do đó có thể

kháng định KH6 phân lập từ Hòn Một trong nghiên cứu này kháng kháng sinh cefazolin. Trước đó, theo kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Miên và nnk., (2010) [11], 28 chủng vi khuẩn phân lập từ san hô mềm *Sinularia* spp. tại Hòn Tằm được thử nghiệm kháng tetracycline, gentamicin và cefazolin, duy nhất có 1 chủng được định danh là *Bacillus cereus* kháng cefazolin. Ngoài ra, chủng vi khuẩn Gram âm T7 có vòng vô khuẩn rất nhỏ là 2 mm (trương đương đường kính 4 mm) cũng cho thấy

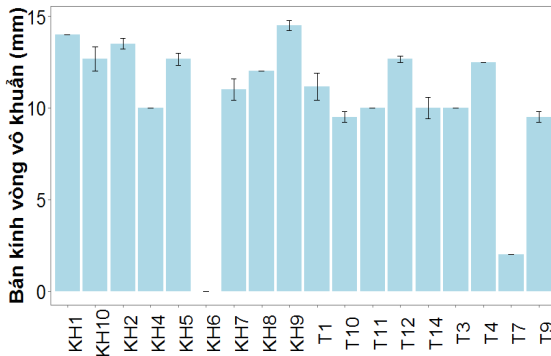
chủng này cũng nằm trong vùng R-“kháng kháng sinh”, đa số vi khuẩn Gram âm được coi là kháng kháng sinh khi đường kính vòng vô khuẩn  $D \leq 12$  mm đối với các kháng sinh đang dùng trong xét nghiệm (CLSI, 2014). Kháng sinh cefazolin thuộc thể hệ thứ nhất của nhóm beta-lactam, đã được dùng từ rất lâu và có thể nó đã được sử dụng cho nuôi thủy sản trong vịnh Nha Trang và do đó việc xuất hiện vi khuẩn kháng kháng sinh này là hoàn toàn có thể xảy ra.



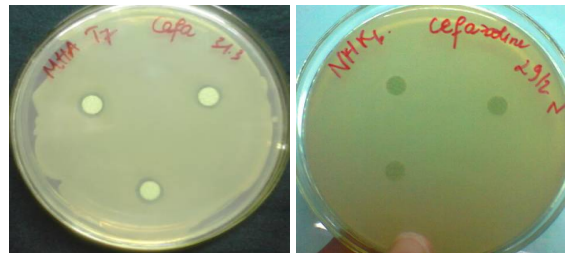
A. Chloramphenicol



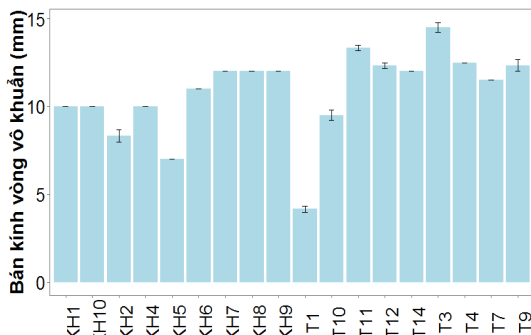
B. Tetracycline



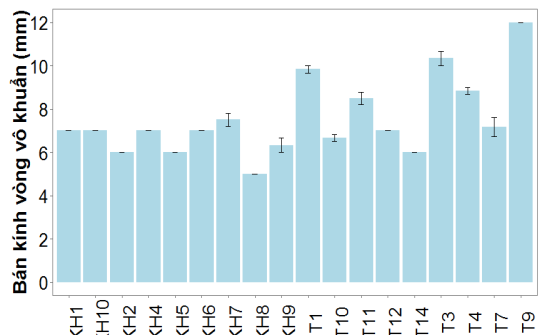
C. Cefazolin



D. KH6 và T7 kháng Cefazolin



E. Streptomycin



F. Gentamicin

Hình 2. Bán kính vòng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn đối với kháng sinh Chloramphenicol -A, Tetracycline -B, Cefazolin -C,D, Streptomycin-E và Gentamicin-F

Trong nghiên cứu này, các kháng sinh chloramphenicol, tetracycline, cefazolin, gentamicin được thử nghiệm với các nồng độ tương tự các nghiên cứu khác đã đề cập, riêng streptomycin được thử nghiệm ở 300 µg (hình 2E). Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn Gram âm T3 nhạy cảm nhất với bán kính vòng vô khuẩn gần 14,5 mm. Vi khuẩn Gram dương KH5, KH2, T10 lần lượt là 7; 8,5; 9,5 mm. Các chủng còn lại có vòng vô khuẩn  $\geq 10$  mm, trong khi vi khuẩn Gram âm T1 có vòng kháng khuẩn nhỏ nhất với 4 mm. Vi khuẩn kháng lại streptomycin 10 µg đã được công bố tìm thấy ở những vùng nuôi thủy sản, nghiên cứu của Nguyen và nnk., [6] công bố 27,6% trong tổng số 116 chủng thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng kháng streptomycin 10 µg, 88,8% kháng lại chloramphenicol, 30,2% kháng tetracycline, và 16,4% kháng gentamicin. Trong tổng số 92 chủng *Aeromonas* được kiểm tra, các chủng kháng chloramphenicol chiếm 31,5%, kháng tetracycline chiếm 34,2%, và gentamicin là 5%. Bên cạnh đó, tác giả Từ Thanh Dung và nnk., [16] cũng đã đánh giá sự kháng kháng sinh của 64 chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên gan, thận mù cá tra *Pangasianodon hypophthalmus* ở đồng bằng sông Cửu Long, kết quả cho thấy *E. ictaluri* nhạy cảm với amoxicillin, chloramphenicol, florfenicol, gentamicin, kanamycin, neomycin và nitrofurantoin. Tuy nhiên, đa số vi khuẩn *E. ictaluri* đã kháng với mạnh với streptomycin (10 µg) với 83%, trong khi kháng enrofloxacin chiếm 5%.

Trong hình 2F cho biết vi khuẩn kiểm định với gentamicin, chủng T9 thể hiện tính nhạy cảm với gentamicin nhất với 12,3 mm. Vi khuẩn Gram âm T7 có vòng kháng khuẩn (7 mm) nhỏ nhất trong 4 vi khuẩn Gram âm. Theo (CLSI, 2014), đại diện cho vi khuẩn Gram âm *Pseudomonas aeruginosa* được xác định là kháng gentamicin (10 µg) khi  $D \leq 14$  mm. Trong khi chủng chuẩn Gram dương *Staphylococcus* spp. được xác định là kháng gentamicin (10 µg) khi  $D \leq 12$  mm. Vi khuẩn Gram dương KH2, KH5, T14 cùng có vòng vô khuẩn như nhau và bằng 6 mm đối với gentamicin. Điều đó cho thấy, các chủng T7, KH2, KH5 và T14 nằm ở “ngưỡng” kháng lại kháng sinh gentamicin. Thực hiện trên 1.050

chủng vi khuẩn phân lập trong nước biển vùng nuôi hàu và trong ruột non hàu *Crassostrea hongkongensis* kháng lại 10 loại kháng sinh theo phương pháp của Bauer và Kirby chỉ ra vi khuẩn từ nguồn nước vùng nuôi có tỷ lệ kháng gentamicin là 20%, tetracycline là 15%, trong khi tỷ lệ kháng chloramphenicol tương đối thấp là 5%. Vi khuẩn từ ruột hàu có tỷ lệ kháng tetracycline (18%) cao hơn chloramphenicol (9%) và gentamicin (9%) [17].

Kiểm định ANOVA một chiều cho thấy sự khác biệt giữa bán kính của các chủng vi sinh vật với các kháng sinh là có ý nghĩa thống kê (Chloramphenicol: mean sq = 16,590, Fvalue = 74,65 và  $P < 0,001$ ; Tetracycline: mean sq = 17,158, Fvalue = 161,10 và  $P < 0,001$ ). Cefazolin: mean sq = 43,00 Fvalue = 122,2 và  $P < 0,001$ ; Gentamicin: mean sq = 9,338, Fvalue = 84,04 và  $P < 0,001$ ; Streptomycin: mean sq = 18,022, Fvalue = 229,0 và  $P < 0,001$ ). Kết quả kiểm định ANOVA 2 chiều về sự ảnh hưởng của các loại kháng sinh và các chủng vi khuẩn lên bán kính vòng vô khuẩn cho thấy, bán kính vòng vô khuẩn này chịu ảnh hưởng bởi các loại kháng sinh nhiều hơn so với các chủng vi khuẩn. Và đặc biệt, cả hai yếu tố ảnh hưởng này đều rất có ý nghĩa về mặt thống kê, với  $p < 0,001$ .

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Từ mẫu trầm tích vùng nuôi thủy sản và du lịch ở Hòn Một, đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn, trong đó có 14 chủng Gram dương, 4 chủng Gram âm. Chủng *Bacillus* sp. (KH6) được xác định là kháng kháng sinh cefazolin. Những chủng có vòng vô khuẩn nằm ở vùng R-“kháng kháng sinh” gồm chủng KH1 đối với tetracycline, chủng KH2, KH5 đối với gentamicin, KH9 đối với chloramphenicol, T1 đối với streptomycin, T7 đối với cefazolin và gentamicin, và T14 đối với gentamicin thực sự cần có những nghiên cứu sâu hơn, xác định đến loài các chủng vi khuẩn bằng 16rRNA, kiểm tra và so sánh mức độ kháng kháng sinh với các chủng chuẩn (theo BioRad) để khẳng định chúng đã kháng các kháng sinh trên hay không. Có thể ngoài tự nhiên đã có nhiều hơn các vi khuẩn kháng thuốc, kể cả kháng các kháng sinh khác với 5 kháng sinh đã chọn. Do đó việc nghiên cứu tính kháng thuốc của nhiều chủng



vi khuẩn đối với các loại kháng sinh sẽ góp phần vào việc cảnh báo cho cộng đồng, hơn thế có thể giúp các nhà quản lý trong việc hạn chế việc sử dụng thuốc kháng sinh trong nuôi thủy sản tại Hồ Chí Minh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Silbergeld, E. K., Graham, J., and Price, L. B., 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health*, **29**, 151-169.
2. Guglielmetti, E., Korhonen, J. M., Heikkinen, J., Morelli, L., and Von Wright, A., 2009. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *FEMS microbiology letters*, **293**(1), 28-34.
3. Alderman, D. J., and Hastings, T. S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology*, **33**(2), 139-155.
4. Hoa, P. T. P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D. H., ... and Suzuki, S., 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of The Total Environment*, **409**(15), 2894-2901.
5. Hoa, P. T. P., Nonaka, L., Viet, P. H., and Suzuki, S., 2008. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. *Science of The Total Environment*, **405**(1), 377-384.
6. Nguyen, H. N. K., Van, T. T. H., Nguyen, H. T., Smooker, P. M., Shimeta, J., and Coloe, P. J., 2014. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong delta, Vietnam. *Veterinary Microbiology*, **171**(3), 397-405.
7. Akinbowale, O. L., Peng, H., and Barton, M. D., 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, **100**(5), 1103-1113.
8. Halebian, S., Harris, B., Finegold, S. M., and Rolfe, R. D., 1981. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **13**(3), 444-448.
9. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, London. (1984). Vol 2.
10. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**(4), 493-496.
11. Phạm Thị Miên, Võ Hải Thi, Lê Hoài Hương và Hoàng Xuân Bên. (2010). Phân lập vi khuẩn từ san hô mềm *Sinularia* spp. và thử nghiệm hoạt tính kháng Tetracycline, Gentamicin, Cefazolin của chúng. *Tuyển tập nghiên cứu biển XVII*, 183-195.
12. DCT, R., 2009. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0.
13. CLSI., 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. *The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S24*, Wayne, PA, USA.
14. Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., and Xu, L., 2012. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Research*, **46**(7), 2355-2364.
15. Akinbowale, O. L., Peng, H., and Barton, M. D., 2007. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, **103**(5), 2016-2025.
16. Từ Thanh Dung, Freddy Haesebrouk, Nguyễn Anh Tuấn, Patrick Sorgeloos, Margo Baele và Annemie Decostere, (2010). Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí khoa học*, **15**, 162-171.

17. Wang, R. X., Wang, A., and Wang, J. Y., 2014. Antibiotic resistance monitoring in heterotrophic bacteria from anthropogenic-polluted seawater and the intestines of oyster *Crassostrea hongkongensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **109**, 27-31.

## ANTIBIOTIC RESISTANCES OF MARINE BACTERIA FROM HON MOT, NHA TRANG BAY

**Pham Thi Mien, Dao Viet Ha, Nguyen Kim Hanh**

*Institute of Oceanography, VAST*

**ABSTRACT:** Drug resistance is now an issue of deep scientific concern all over the world as more antibiotic resistant bacteria have been detected in many regions and countries in recent years. Using of antibiotics for aquaculture is quite common in developing countries including Vietnam. This causes the spread of antibiotic resistant bacteria in the environment. Testing of antibiotic resistant bacteria was carried out in commercial marine aquaculture and tourist zones in Hon Mot in the Nha Trang bay with five different antibiotics namely chloramphenicol, tetracycline, cefazolin, streptomycin, and gentamicin on Mueller Hinton Agar. A total of 18 strains composed of 14 Gram positive strains, 4 Gram negative strains were tested for antibiotic resistance. Strain KH1 showed the least sensitive to tetracycline with average radius of 4.0 mm, while strain T1 showed the least sensitive to streptomycin with average radius of 4.2 mm. The strains KH6 and T7 showed resistance to cefazolin with radius of inhibition zone of 0 mm and 2 mm, respectively. The strain KH6 was confirmed as *Bacillus* sp. Antibiotic resistant bacteria were now found in Nha Trang bay, so there may be additional resistant bacteria, even multi-antibiotic resistant bacteria outside the marine environment. This is a matter for further research that should provide solutions to limit the rise of antibiotic resistant bacteria.

**Keywords:** Antibiotic resistant bacteria, Hon Mot, Nha Trang.