

XÁC ĐỊNH VỊ TRÍ PHÂN LOẠI VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG THUỐC KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *Vibrio* PHÁT SÁNG PHÂN LẬP TỪ HẬU ẤU TRÙNG TÔM SÚ (*Penaeus monodon*)

Đặng Thị Hoàng Oanh, Đoàn Nhật Phương,
Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thanh Phương¹

ABSTRACT

A taxonomic relationship of twenty-seven luminous bacterial isolates from shrimp (Penaeus monodon) postlarvae and water together with twenty-six reference strains were investigated by Euclidean distance with unweighted average linkage clustering. Comparison based on forty-one phenotypic characters showed that these isolates mainly clustered in 2 groups equated with the well known Vibrio species which are V. harveyi and V. carchariae. Sensitivity test of these isolates to six antimicrobial agents revealed that all isolates were resistant to ampicillin, and about or less than 15% tested isolates were resistant to tetracycline, chloramphenicol, nitrofurantoin, norfloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole. The majority of isolates tested (77%) exhibited single resistance to tested antibiotics whereas 15% were resistant to 2 antibiotics. There were a resistance to 4 and 6 antibiotics tested but only one isolate was found in each case.

Keywords: Luminous bacteria, *Penaeus monodon*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio carchariae*

Title: Characterization of luminous bacterial isolated from shrimp (*Penaeus monodon*) post larvae

TÓM TẮT

Vị trí phân loại của hai mươi bảy chủng vi khuẩn phát sáng phân lập từ Tôm sú (*Penaeus monodon*) giống và nước trại ương được xác định bằng phương pháp phân tích cụm cùng với 26 chủng vi khuẩn chuẩn và chủng tham khảo dựa vào khoảng cách Euclid-UPGMA. Kết quả so sánh qua 41 chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hóa cho thấy các chủng vi khuẩn phát sáng nghiên cứu phân thành ba nhóm chủ yếu cùng với vi khuẩn chuẩn và vi khuẩn tham khảo. Tuy nhiên chúng chỉ thuộc vào hai loài vi khuẩn là *V. harveyi* và *V. carchariae*. Kết quả kháng sinh đồ 26 trong số 27 chủng nói trên với 6 loại thuốc kháng sinh thông dụng trong nuôi Thủy sản cho thấy 100% chủng thử nghiệm kháng với ampicilin, và có khoảng từ (hoặc ít hơn) 15% kháng với trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, chloramphenicol, nitrofurantoin và norfloxacin. Phần lớn (77%) các chủng chỉ kháng với một loại kháng sinh. Số chủng kháng với 2 loại kháng sinh là 15%. Có một chủng kháng 4 loại và một chủng kháng với cả 6 loại kháng sinh thử nghiệm.

Từ khóa: vi khuẩn phát sáng, Tôm sú, *Vibrio harveyi*, *Vibrio carchariae*

1 GIỚI THIỆU

Bệnh do một số loài vi khuẩn thuộc nhóm *Vibrio* spp. đã được công bố là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng ở một số đối tượng nuôi thủy sản (Austin & Austin 1993). Bên cạnh *Vibrio anguillarum* và *V. ordalii* được xem là một trong những tác nhân gây bệnh chủ yếu thuộc nhóm *Vibrio* spp., một số loài thuộc nhóm này cũng được công bố là tác nhân gây bệnh ở một số đối tượng nuôi thủy sản quan trọng. Một số trường hợp điển hình như: *V. vulnificus* ở cá chình *Anguilla anguilla* (Biosca et al., 1991); *V. alginolyticus* ở cá Tráp *Sparus aurata* và cá Mú *Epinephelus*

¹ Trung Tâm Quản lý Dịch bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

malabaricus (Colorni *et al.* 1981; Lee 1995); *V. salmonicida* ở cá Hồi (Austin & Austin 1993); *V. damsela* (còn gọi là *Photobacterium damsela*) ở cá bon *Scophthalmus maximus*, cá Hồi *Oncorhynchus mykiss* và cá Mập *Oreotolobus ornatus* (Fouz *et al.* 1992; Pedersen *et al.* 1997).

Một số loài vi khuẩn *Vibrio* có khả năng phát sáng như *Vibrio harveyi*, *V. splendida*, *V. orientalis*, *V. fischeri*, *Vibrio vulnificus*. Trong đó, *V. harveyi* đã được xác định là tác nhân gây bệnh phát sáng ở trai ngọc *Pinctada maxima*, Tôm sú *Penaeus monodon* và tôm he Nhật bản *Penaeus japonicus* (Pass *et al.* 1987; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Karunasagar *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Leano *et al.* 1998). Bệnh do nhóm vi khuẩn phát sáng đã gây thiệt hại kinh tế trong nuôi tôm công nghiệp ở Philipines, Ấn Độ và Indonesia. Các nghiên cứu cho thấy việc giảm sút sản lượng tôm nuôi có liên quan đến bệnh vi khuẩn do chính nhóm vi khuẩn phát sáng gây ra. Ở Việt Nam, những dạng nhiễm vi khuẩn phát sáng thường thấy ở trại sản xuất hoặc ương tôm giống. Khi vi khuẩn phát sáng hiện trong cơ thể tôm với số lượng lớn có thể làm tôm nhiễm bệnh phát sáng trong bóng tối. *Vibrio* phát sáng có thể phát thành dịch và gây chết đến 100% ấu trùng tôm, tôm giống và kể cả tôm trưởng thành. Chính vì vậy mà bệnh phát sáng ở tôm được liệt kê vào danh sách các chỉ tiêu kiểm dịch tôm giống. Ở các trại sản xuất tôm giống, thuốc kháng sinh hiện vẫn là cách phổ biến sử dụng để phòng bệnh phát sáng. Trên thực tế, những nghiên cứu chi tiết về đặc điểm phân loại và khả năng kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn phát sáng trên Tôm sú nuôi ở vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long còn rất hiếm để có thể sử dụng làm cơ sở cho việc nghiên cứu phương pháp phòng bệnh.

Trong khoảng thời gian từ tháng 2 năm 2001 đến tháng 3 năm 2003, phòng thí nghiệm bệnh học thủy sản thuộc Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ phân lập được một số chủng vi khuẩn phát sáng trong số các mẫu tôm giống được yêu cầu xét nghiệm. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số đặc điểm về hình thái, sinh lý, sinh hoá nhằm xác định vị trí phân loại của chúng. Đồng thời, khả năng kháng thuốc của các chủng vi khuẩn này với một số loại thuốc kháng sinh thông dụng trong nuôi trồng thủy sản cũng được xác định.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp thu mẫu tôm và phân lập vi khuẩn phát sáng

Mẫu được thu là mẫu tôm giống còn sống chứa trong túi nylon có bơm oxy, mỗi mẫu thu 20 con. Mặt ngoài cơ thể tôm được khử trùng bằng cồn 70°, rửa lại bằng nước muối sinh lý (0.85% NaCl), cho vào ống nghiệm chứa 2ml nước muối sinh lý và nghiền mẫu bằng que thủy tinh. Sau đó mẫu được cấy vào đĩa môi trường TCBS và đĩa môi trường phát sáng (nutrient agar; 1% NaCl; 0.4% MgCl₂.6H₂O và 0.2%KCl), ủ trong tủ úm ở nhiệt độ 28°C và kiểm tra kết quả phân lập sau 24 giờ. Những đĩa có những khuẩn lạc phát ra ánh sáng màu xanh nhạt ở trong bóng tối được chọn để lưu trữ cho các phân tích tiếp theo. Các chủng vi khuẩn được trữ ở -80°C trong môi trường nutrient broth (NB, Oxoid) có chứa 15% glycerol và 1% (w/v) NaCl. Nguồn gốc các chủng vi khuẩn nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Nguồn gốc các chủng vi khuẩn nghiên cứu (No. 1-27) và vi khuẩn chuẩn (No. 28-53)

STT	Mã số phòng thí nghiệm	Nguồn gốc phân lập	Địa điểm thu mẫu	Kết quả định danh
1	PQ-V01	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Mũi Nai	<i>Vibrio carchariae</i>
2	PQ-V10	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Bạc Liêu	<i>Vibrio carchariae</i>
3	PQ-V13	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Phú Quốc	<i>Vibrio carchariae</i>
4	PQ-V14	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Phú Quốc	<i>Vibrio carchariae</i>
5	PQ-V15	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Phan Thiết	<i>Vibrio harveyi</i>
6	PQ-V16	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Phan Thiết	<i>Vibrio harveyi</i>
7	PQ-V17	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	-	<i>Vibrio harveyi</i>
8	PQ-V18	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	-	<i>Vibrio harveyi</i>
9	PQ-V19	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Đà Nẵng	<i>Vibrio harveyi</i>
10	PQ-V20	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Đà Nẵng	<i>Vibrio carchariae</i>
11	PQ-V24	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Bạc Liêu	<i>Vibrio carchariae</i>
12	PQ-V26	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Bạc Liêu	<i>Vibrio carchariae</i>
13	PQ-V30	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Cam Ranh	<i>Vibrio carchariae</i>
14	PQ-V31	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Cam Ranh	<i>Vibrio carchariae</i>
15	PQ-378	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Cam Ranh	<i>Vibrio harveyi</i>
16	PQ-431	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	-	<i>Vibrio harveyi</i>
17	PQ-434	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	-	<i>Vibrio harveyi</i>
18	PQ-497	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Khánh Hòa	<i>Vibrio harveyi</i>
19	PQ-584	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Phan Thiết	<i>Vibrio harveyi</i>
20	PQ-613	<i>Penaeus monodon</i> /Postlarvae	Cà Mau	<i>Vibrio harveyi</i>
21	PQ-A1.1	Water	Bạc Liêu	<i>Vibrio harveyi</i>
22	PQ-A1.2	Water	Bạc Liêu	<i>Vibrio carchariae</i>
23	PQ-A1.3	Water	Bạc Liêu	<i>Vibrio harveyi</i>
24	PQ-A1.4	Water	Bạc Liêu	<i>Vibrio harveyi</i>
25	PQ-A1.5	Water	Bạc Liêu	<i>Vibrio harveyi</i>
26	PQ-BL1	Water	Bạc Liêu	<i>Vibrio harveyi</i>
27	PQ-V332	Water	Bạc Liêu	<i>Vibrio harveyi</i>
28	V. anguillarum ATCC 19264 T	Gadus morhua	-	-
29	V. fluvialis NCIMB 2249 T	người	-	-
30	V. furnissii ATCC 35016 T	người	-	-
31	V. natriegens ATCC 33898 T	-	-	-
32	V. pelagius biovar I NCIMB 1900 T	nước	-	-
33	V. pelagius biovar II NCIMB 2253 T	-	-	-
34	V. alginolyticus ATCC 33838 T	-	-	-
35	V. carchariae ATCC 43516 T	-	-	-

STT	Mã số phòng thí nghiệm	Nguồn gốc phân lập	Địa điểm thu mẫu	Kết quả định danh
36	V. cholerae 889, - O1, Ogawa	-	-	-
37	V. harveyi ATCC 33866 T	-	-	-
38	V. mimicus ATCC 33653 T	người	-	-
39	V. tubiashii NCIMB 1340 T	ấu trùng nhuyễn thể	-	-
40	V. splendidus biovar I NCIMB 1 T	cá	-	-
41	V. splendidus biovar II NCIMB 2251 T	nước	-	-
42	V. ichthyenteri HWU P 8603	-	-	-
43	V. hollisae NCTC 11640 T	-	-	-
44	V. penaeicida KH-1 T	tôm	-	-
45	V. ordalii ATCC 33509 T	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	-	-
46	V. nigripulchritudo LMG 3896 T	nước	-	-
47	V. navarrensis CIP 103193 T	-	-	-
48	V. harveyi S75	<i>Pangasius bocourti/ lá lách</i>	-	-
49	V. harveyi S80	<i>Penaeus monodon/Postlarvae</i>	-	-
50	V. harveyi S84	<i>Penaeus monodon/Postlarvae</i>	-	-
51	V. harveyi S87	<i>Penaeus monodon/Postlarvae</i>	-	-
52	V. harveyi S88	<i>Pangasius bocourti/ thân</i>	-	-
53	V. harveyi S91	<i>Pangasius bocourti/ lá lách</i>	-	-

ATCC: American Type Culture Collection; T: Type strain; NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen,

UK; AAHRI: Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand; HWU: Heriot-Watt University, Edinburgh, UK;

NTCC: National Type Culture Collection, Colindale, UK; LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Rijksuniversiteit Gent, Belgium;

CIP: Collection of the Pasteur Institute, Paris, France; Vietnamese strains (Oanh et al, 2002).

2.2 Phương pháp xác định các chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hóa

Hình dạng, kích thước và tính rỗng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow & Feltham 1993). Khả năng di động của vi khuẩn được quan sát bằng cách nhỏ một giọt nước cất lên lam, lấy que cấy trải đều lên lam một ít vi khuẩn. Đặt lại bằng lammela và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 100X.

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa được chọn để định danh vi khuẩn phát sáng (Bảng 2) dựa theo các chỉ tiêu chẩn đoán vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh ở Thủy

sản của Larsen & Pedersen (1999). Các đặc điểm sinh lý sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan and Steels (Barrow và Feltham, 1993) và phương pháp của West & Colwell (1984). Mỗi chỉ tiêu được xác định ba lần, kết quả được ghi nhận là kết quả có ít nhất 2 lần lặp lại.

Các chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hoá được mã hoá bằng số 0 tương ứng với kết quả âm tính và số 1 tương ứng với kết quả dương tính. Số liệu sau đó được sử dụng để xác định mức độ giống nhau giữa các chủng vi khuẩn phân lập và biểu hiện bằng sơ đồ quan hệ qua chương trình phân tích cụm (Priest & Austin 1993) sử dụng phần mềm NCSS 97. Mức độ giống nhau giữa các chủng vi khuẩn được xác định bằng khoảng cách Euclid-UPGMA (Euclidean distance with unweighted average linkage).

2.3 Lập kháng sinh đồ

Khả năng kháng thuốc của vi khuẩn được xác định theo phương pháp của Huys *et al.* (2005). Vi khuẩn được phục hồi trên môi trường ISA (Iso-Sensitest Agar; Oxoid, Basingstoke, Anh) ở 28°C trong vòng 24 giờ, mỗi đợt lập kháng sinh đồ có 9 dòng vi khuẩn cần thử nghiệm và chủng vi khuẩn chuẩn *E. coli* LMG 8223. Tính rỗng của vi khuẩn sau khi phục hồi được kiểm tra bằng cách quan sát sự đồng nhất về hình dạng, kích thước, màu sắc của khuẩn lạc và nhuộm Gram. Các khuẩn lạc ở mỗi đĩa ISA sau 24 giờ nuôi cấy được nhặt bằng que cấy và cho vào ống nghiệm có chứa 5ml dung dịch 0.85% NaCl để tạo dung dịch vi khuẩn có độ đục tương ứng với dung dịch chuẩn 1.0 McFarland. Sau đó, 100 µL dung dịch vi khuẩn được tán đều trên bề mặt đĩa kháng sinh (Oxoid) bao gồm tetracycline (TE30), ampicillin (AMP10), chloramphenicol (C30), nitrofurantoin (F/M300), norfloxacin (NOR10), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT 1.25/23.75) được đặt trên mặt thạch và ủ 24 giờ ở 28°C. Đường kính vòng tròn vô trùng được đo bằng mm, dòng vi khuẩn trên đĩa ISA tương ứng sẽ được xác định là kháng, nhạy hay trung gian với kháng sinh thử nghiệm dựa theo hướng dẫn của NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Phần mềm Microsoft Excel được sử dụng để tính toán và thể hiện các đồ thị tỉ lệ phần trăm các dòng vi khuẩn kháng thuốc.

3 KẾT QUẢ

Kết quả quan sát và phân tích các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn nghiên cứu được trình bày ở Bảng 2. Sơ đồ quan hệ giữa các chủng vi khuẩn nghiên cứu và chủng chuẩn qua kết quả phân tích cụm các chỉ tiêu trên được trình bày ở hình 1. Qua kết quả phân tích cụm, hai mươi bảy chủng vi khuẩn phát sáng nghiên cứu chia thành ba nhóm đồng dạng với các chủng chuẩn là *V. harveyi* S87 (2 chủng), *V. harveyi* S88 (15 chủng) và *V. Carchariae* (10 chủng). Kết quả định danh đến mức loài các chủng vi khuẩn phát sáng dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá được trình bày ở Bảng 1.

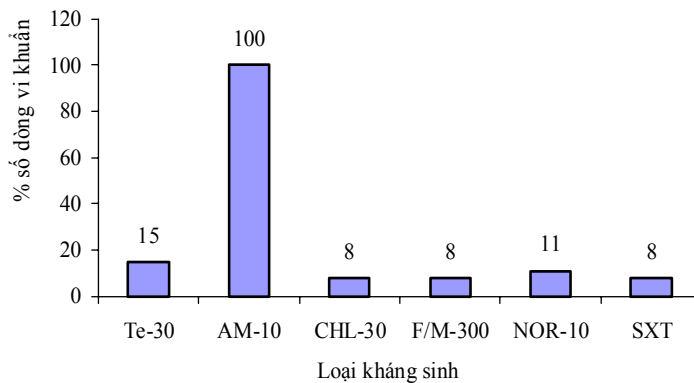
3.1 Nhóm *V. harveyi* S87

Có hai chủng vi khuẩn phát sáng nghiên cứu nhóm với chủng tham khảo *V. harveyi* S87 qua phân tích cụm (Hình 1). Các chủng vi khuẩn này không trượt trên

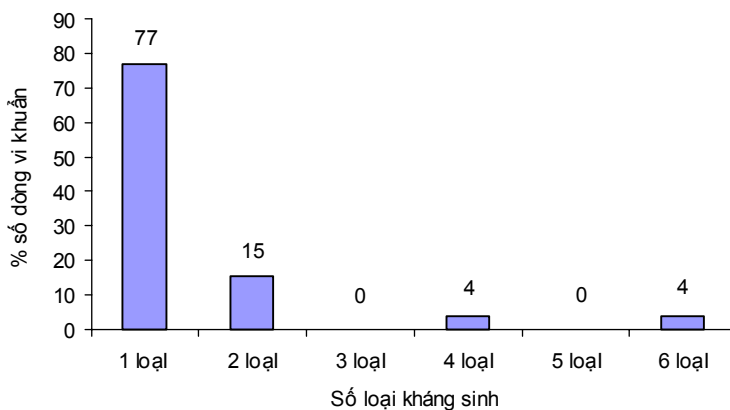
không trượt trên mặt thạch và có đường kính khuẩn lạc khoảng 2-2.5 mm sau khi để 48 giờ ở 28°C. Khuẩn lạc có hình tròn, sáng, bóng và có màu kem trên mặt thạch dưỡng (nutrient agar). Các chủng đều cho phản ứng dương với lysine và ornithine và phản ứng âm với arginine. Tuy nhiên toàn bộ các chủng nghiên cứu đều phát triển trong môi trường 1% peptone không có bổ sung NaCl trong khi chủng chuẩn *V. carchariae* ATCC 43516 không có khả năng phát triển trong môi trường 0% NaCl. Khả năng phát triển ở 6% NaCl của các chủng vi khuẩn phát sáng nhóm này cũng biến động (6/10). Ngoài ra các chỉ tiêu sinh ureaza, Thủy phân tinh bột, sinh axit từ arabinose, lactose, sucrose và xylose của chúng cũng biến động (Bảng 2).

3.4 Kết quả kháng sinh đồ

Kết quả kháng sinh đồ của 26 trong số 27 dòng vi khuẩn phát sáng được thử với 6 loại thuốc kháng sinh thường dùng trong nuôi thủy sản cho thấy 100% số dòng vi khuẩn thử nghiệm kháng với ampicilin. Các dòng vi khuẩn phát sáng thử nghiệm mẫn cảm với chloramphenicol, norfloxacin và nitrofurantoin hơn so với tetracycline và trimethoprim/sulfamethoxazole (Hình 1). Phần lớn các dòng vi khuẩn thử nghiệm chỉ kháng với một loại kháng sinh (77%). Có khoảng 15% dòng vi khuẩn kháng với 2 loại kháng sinh, và 4% kháng với 4 loại thuốc được thử (Hình 3). Có 4% số dòng vi khuẩn kháng với cả 6 loại kháng sinh thử nghiệm.



Hình 2: Tỷ lệ các dòng vi khuẩn kháng với các loại thuốc kháng sinh thử nghiệm (Te: tetracycline, AM: ampicillin, CHL: Chloramphenicol, F/M: nitrofurantoin, NOR: norfloxacin, và SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole)



Hình 3: Tỷ lệ các dòng vi khuẩn đơn kháng hoặc đa kháng với nhiều loại kháng sinh

Bảng 2: Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của các chủng vi khuẩn phát sáng nghiên cứu so với chủng chuẩn

Chi tiêu	<i>V. har.</i>	<i>V. har.</i>	<i>V. har.</i>	<i>V. har.</i>	<i>V. har.</i>	<i>V. har.</i>	<i>V. har.</i>	<i>V. car.</i>	<i>V. har.</i>	<i>V. har.</i>	<i>V. car.</i>
	ATCC 33866	VN S75	VN S80	VN S84	VN S87	VN S88	VN S91	ATCC 43516	VN (n=15)	VN (n=2)	VN (n=10)
Nhuộm Gram	âm	âm	âm	Âm	âm	Âm	âm	âm	âm	âm	âm
Hình dạng	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn
Trượt trên mặt thạch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Di động	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinh catalaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinh oxidaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tạo màng trong môi trường lỏng	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sắc tố khuẩn lạc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mọc trên môi trường có											
0% NaCl	-	-	-	-	+	-	-	-	10	-	+
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	6
10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phản ứng lên men yếm khí	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phản ứng lên men hiếu khí	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinh ureaza	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	7
Mọc trên môi trường TCBS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phản ứng với hợp chất O/129 150 µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phát sáng	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Sử dụng citrat	-	-	-	-	-	-	-	+	1	-	-
Sinh indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phản ứng VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tạo nitrit từ nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinh amylaza	-	-	+	-	-	-	+	+	9	-	9
Thủy phân gelatin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sử dụng tween 80	-	+	-	+	+	+	+	+	11	+	-
Tạo axit từ glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinh gas từ glucose	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Sử dụng											
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	+	4	-	8
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	+	1	-	9
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	-	+	-	-	-	-	+	5	-	7
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	8

+ tất cả các chủng đều dương;

- tất cả các chủng đều âm; chữ số cho biết số các chủng dương;

VN: vi khuẩn phân lập tại Việt Nam

4 THẢO LUẬN

Tất cả các chủng vi khuẩn phát sáng phân lập được đều có những đặc điểm hình thái điển hình của vi khuẩn giống *Vibrio*. Các đặc điểm đó là di động, cho phản ứng oxidase và catalase dương tính, là vi khuẩn Gram âm, hình que, có khả năng lên men glucose trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí, tạo nitrit từ nitrat, mọc trên môi trường chọn lọc cho nhóm *Vibrio* (Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose-

TCBS) và nhất là nhạy với hợp chất 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine (O/129, 150 µg) là hợp chất giúp phân biệt vi khuẩn *Vibrio* và *Aeromonas* (West *et al.* 1986). Hơn nữa, các chủng vi khuẩn phát sáng đều phát triển tốt ở môi trường có 3 % NaCl, sinh indole và có khả năng tạo axit từ mannitol và trehalose.

V. harveyi là vi khuẩn phát sáng được xem như là tác nhân gây bệnh quan trọng có thể gây chết tôm hàng loạt trong quá trình sản xuất tôm giống nhân tạo (Leano *et al.*, 1998). Phần lớn các chủng vi khuẩn nghiên cứu được phân lập từ tôm giống (20/27), số còn lại được phân lập từ nước. Alsina & Blanch (1994) cho biết *V. harveyi* và *V. carchariae* chủ yếu khác nhau ở khả năng sử dụng arabinose làm nguồn thức ăn cacbon. Các chủng vi khuẩn phát sáng phân lập được biểu hiện khác nhau (12/27) về khả năng sử dụng arabinose làm nguồn cacbon. Khả năng sinh ureaza được cho là đặc điểm quan trọng về khả năng gây bệnh của vi khuẩn *V. carchariae*, tuy nhiên một số chủng *V. harveyi* cũng đã được phát hiện có thể sinh ureaza (Bryant *et al.* 1986; Pedersen *et al.* 1998). Điều này phù hợp với kết quả định danh các chủng vi khuẩn phát sáng nghiên cứu là *V. harveyi* có chỉ tiêu ureaza dương tính. Thêm vào đó, Pedersen *et al.* (1998) đã chứng minh vị trí phân loại của *V. carchariae* là một dạng thấp hơn của *V. harveyi*, điều này cũng thấy rõ qua sơ đồ quan hệ ở hình 1 khi so sánh chủng chuẩn *V. harveyi* ATCC 33866 và *V. carchariae* ATCC 43516. Để khẳng định một cách chắc chắn hơn về vị trí phân loại của các chủng vi khuẩn phát sáng nghiên cứu, các phân tích bằng kỹ thuật phân tử như xác định trình tự rRNA và lai ADA sẽ rất hữu ích.

Các chủng vi khuẩn có chung một khả năng kháng thuốc kháng sinh ampicillin (100%). Ngoài ra một số chủng còn kháng với tetracyclin, chloramphenicol, nitrofurantoin, norfloxacin và trimethoprim/sulfamethoxazole. Điều này cho thấy việc sử dụng những loại thuốc kháng sinh trên để phòng bệnh phát sáng không phải lúc nào cũng có hiệu quả. Phần lớn các chủng (77%) vi khuẩn chỉ đơn kháng với một loại kháng sinh nhưng cũng có chủng kháng 2 loại kháng sinh (15%). Có trường hợp kháng 4 và 6 loại kháng sinh. Điều này cho thấy khả năng đa kháng kháng sinh ở vi khuẩn phát sáng là một mối nguy cần được quan tâm.

5 KẾT LUẬN

Kết quả so sánh qua 41 chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hoá cho thấy các chủng vi khuẩn phát sáng nghiên cứu thuộc vào hai loài *V. harveyi* và *V. carchariae*. Các chủng vi khuẩn này kháng với ampicillin, một số kháng với trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracyclin, chloramphenicol, nitrofurantoin và norfloxacin. Mặc dù đa số các chủng phát sáng nghiên cứu chỉ kháng với một loại kháng sinh, một số chủng đã có khả năng kháng với nhiều loại kháng sinh. Thông tin về vị trí phân loại và khả năng kháng thuốc của vi khuẩn phát sáng sẽ rất hữu ích trong việc phát triển các phương thức phát hiện mầm bệnh phát sáng trong nghề nuôi tôm và việc đề xuất các giải pháp quản lý sử dụng thuốc kháng sinh trong các trại sản xuất tôm giống.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Cô Huỳnh Kim Hường và Cô Phạm Thị Phương Mai đã tham gia thực hiện các phản ứng sinh lý, sinh hoá và lập kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn phát sáng nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alsina, M. & A.R. Blanch. 1994a. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 79-85.
- Alsina, M. & A.R. Blanch. 1994b. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 719-721.
- Austin, B. & D.A. Austin. 1993. *Bacterial fish pathogens, Diseases in farmed and wild fish*, 2nd edn. Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- Barrow, G.I. & R.K.A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Biosca, E. G., C. Amaro, C. Esteve, E. Alcaide & E. Garay. 1991. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases* 14: 103-109.
- Bryant, T.N., J.V. Lee, P.A. West & R.R. Colwell. 1986a. Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera. *Journal of Applied Bacteriology* 61: 437-467.
- Colorni, A., I. Paperna & H. Gordin. 1981. Bacterial infection in gilt-head sea bream *Sparus aurata* cultured at Elat. *Aquaculture* 23: 257-267.
- Fouz, B., J.L. Larsen, B. Nilsen, J.L. Barja & A.E. Toranzo. 1992. Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*) in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 155-166.
- Huys, G., M. Cnockaert, K. Bartie, D.T.H. Oanh, N.T. Phuong, T. Somsiri, S. Chinabut, F. Yusoff, M. Shariff, M. Giacomini, S. Bertone, J. Swings and A. Teale (2005). Intra- and interlaboratory performance of antibiotic disk diffusion susceptibility testing of bacterial control strains of relevance for monitoring aquaculture environments. *Diseases of Aquatic Organisms*. 66: 179-204.
- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi & I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128: 203-209.
- Larsen, J.L. & K. Pedersen. 1999. Diagnostic schemes for *Vibrio* species.
- Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda & L.D. de la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91: 1-13.
- Leano, E.M., C.R. Lavilla-Pitogo & M.G. Paner. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminescent vibriosis. *Aquaculture* 164: 367-374.
- Lee, K.K. 1995. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Microbial Pathogenesis* 19: 39-48.
- Liu, P., K. Lee, K. Yui, G. Kou & S. Chen. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns. *Current Microbiology* 33: 129-132.
- Oanh, D.T.H, K. Pedersen and J.L. Larsen (2002). Identification and characterization of *Vibrio* bacteria isolated from fish and shell fish in Vietnam. In *Diseases in Asian Aquaculture IV*. C.R. Lavilla-Pitogo & E.R. Cruz-Lacierda (eds). Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

- Pass, D.A., R. Dybdahl & M.M. Mannion. 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* 65: 149-169.
- Pedersen, K., I. Dalsgaard & J.L. Larsen. 1997. *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (9): 3711-3715.
- Pedersen, K., L. Verdonck, B. Austin, D.A. Austin, A.R. Blanch, P.A.D. Grimont, J. Jofre, S. Kobravi, J. L. Larsen, T. Tiainen, M. Vigneulle & J. Swings. 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 749-758.
- Priest, F. & B. Austin. 1993. *Modern Bacterial Taxonomy*, 2nd edn. Chapman & Hall, London.
- West, P.A., P.R. Brayton, T.N. Bryant & R.R. Colwell. 1986. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36 (4): 531-543.
- West, P.A. & R.R. Colwell. 1984. Identification and classification of *Vibrionaceae*-an overview. Pp. 285-363 in: R.R. Colwell (edn). *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons, New York.