

PHÂN LẬP VÀ ĐẶC ĐIỂM CÁC CHỦNG *Enterococcus faecalis* TRÊN CÁ CHÌNH HOA (*Anguila marmorata*) NUÔI TẠI QUẢNG BÌNH

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

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyennhocphuc@huaf.edu.vn

Nhận bài: 09/05/2021 Hoàn thành phản biện: 27/05/2021 Chấp nhận bài: 01/06/2021

TÓM TẮT

Enterococcus là một trong những tác nhân gây bệnh phổ biến trên cá nuôi trên thế giới. Nghiên cứu này đã phân lập được 10 chủng *Enterococcus* từ 10/15 mẫu cá chình có dấu hiệu bụng sưng to và xuất huyết ở xương nắp mang. Dấu hiệu bệnh tích cho thấy gan, thận, lách bị sưng to và xuất huyết. Tất cả các chủng *Enterococcus* được xác định là nhóm D bằng phản ứng ngưng kết kháng nguyên Lancefield. Các chủng này khá đồng nhất về mặt sinh hoá, đều là cầu khuẩn, Gram dương, không di động, cho phản ứng oxidase và catalase âm tính, không làm tan huyết trên môi trường thạch máu. Kết quả định danh bằng giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy cả 10 chủng vi khuẩn phân lập được đều là *Enterococcus faecalis*. Nghiên cứu khả năng miễn cảm kháng sinh cho kết quả cả 10 chủng đều kháng với ampicillin, tetracycline và oxytetracycline, trong khi đó các loại kháng sinh gentamycin, penicillin, erythromycin và ciprofloxacin đều nhạy với các chủng vi khuẩn này. Đây là nghiên cứu đầu tiên về phân lập và nghiên cứu đặc điểm sinh hoá của *E. faecalis* phân lập trên cá chình bị bệnh tại tỉnh Quảng Bình (nói riêng) và tại Việt Nam (nói chung).

Từ khóa: *Anguila marmorata*, Cá chình hoa, *Enterococcus faecalis*, Kháng thuốc, Quảng Bình

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE *Enterococcus faecalis* STRAINS ISOLATED FROM GIANT MOLTED EEL (*Anguila marmorata*) IN QUANG BINH PROVINCE

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

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

Enterococcus is one of the major pathogens in farmed fish in the world. In this study, 10 isolates of *Enterococcus* were recovered from 10 diseased eels showed the hemorrhagic traces in the operculum and swollen in body cavity. Internally, the kidney, liver and spleen were enlarged and hemorrhagic. All isolates of *Enterococcus* were identified as Group D by Lancefield test. Biological characteristics of isolates were homogeneous, consisting of cocci, non-motile, negative reaction with oxidase, catalase, and showed non-haemolytic in the blood agar. The morphological, biochemical, and sequencing analysis using the 16S rRNA universal gene of ten isolates from ten diseased eels resulted were *Enterococcus faecalis*. Antibiotics susceptibility test indicated that the isolates were resistant to ampicillin, tetracycline and oxytetracycline and sensitive to gentamycin, penicillin, erythromycin and ciprofloxacin. To our knowledge, this is the first study on isolation and characterization of the *E. faecalis* strain isolated from farmed eels in Quang Binh province particularly and Vietnam generally.

Keywords: *Anguila marmorata*, Giant molted eel, Antibiotic resistant, *Enterococcus faecalis*, Quang Binh

1. MỞ ĐẦU

Cá chình hoa (*Anguilla marmorata*) là loài cá có dinh dưỡng cao và rất có giá trị kinh tế, là loại thực phẩm được ưa chuộng trên thị trường trong nước và quốc tế. Ở các tỉnh miền Trung Việt Nam, bên cạnh những đối tượng nuôi chủ lực như tôm thẻ chân trắng, tôm sú, thì cá chình hoa là đối tượng nuôi nước ngọt có tiềm năng phát triển vì giá trị kinh tế cao. Cá chình hoa được nuôi ở tỉnh Quảng Bình từ những năm 2005 và là đối tượng nuôi phổ biến hiện nay. Tuy nhiên, ở Việt Nam các nghiên cứu trên cá chình chủ yếu tập trung về phân bố, thành phần loài và rất ít nghiên cứu về bệnh trên cá chình đặc biệt là bệnh do vi khuẩn gây ra (Tư Thanh Dung và cs., 2014). Trong những năm gần đây, tại Quảng Bình đã có một số cá chình hoa chết với dấu hiệu bệnh lý do vi khuẩn gây ra như bụng sưng to, xoang bụng chứa nhiều dịch nhầy, xuất huyết ở các nội quan như gan, thận, lách

Vi khuẩn được xem là tác nhân gây bệnh cho các loài cá nuôi nước mặn và nước ngọt trên toàn thế giới (Thurne và cs., 1993; Austin và Austin, 2012), trong đó *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, và *Streptococcus* là những chi vi khuẩn gây bệnh phổ biến ở nhiều loài cá nước ngọt ở vùng nhiệt đới (Thurne và cs., 1993). Bệnh do vi khuẩn gây ra trên cá có thể gây tỷ lệ chết lên đến 50% trong 3 đến 5 ngày và ảnh hưởng nặng nề đến sản lượng nuôi (Yanong và France-Floyd, 2002; Austin và Austin, 2012). Bên cạnh đó, nhiều báo cáo cho thấy tác nhân vi khuẩn cơ hội khác cũng đã gây dịch bệnh trên nhiều loài cá nuôi khác nhau trong đó có nhóm cầu khuẩn Gram dương *Enterococcus* (Khafagy và cs., 2009; Rahman và cs., 2017; Rizkiantino và cs., 2020). *Enterococcus* spp. là một thành phần trong hệ vi sinh vật ở xoang miệng, hệ tiêu hoá và hệ sinh dục ở người và động vật,

phân bố rộng rãi trong đất, nước và thực vật. Hiện nay, chi *Enterococcus* có hơn 50 loài trong đó phổ biến nhất là *Enterococcus faecalis*, sau đó là *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* and *E. mundti* (Novais và cs., 2018). *Enterococcus* spp. gây bệnh trên cá được phát hiện đầu tiên trên cá cam (*Seriola quinqueradiata*) nuôi tại Nhật Bản (Kusuda và Salati, 1993), trên cá bơn (*Scophthalmus maximus*) (Nieto và cs., 1995) và trên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) (Plumb và Hanson, 2010). *E. faecalis* đã được phát hiện là tác nhân gây bệnh trên cá rô phi ở Ai Cập (Ahmed và El- Refaey., 2003; Emman và cs., 2019), Thái Lan (Petersen và Dalsgaard, 2003), Bangladesh (Rahman và cs., 2017), và Indonesia (Rizkiantino và cs., 2020). Ngoài ra, *Enterococcus* còn được phân lập từ môi trường nước xung quanh các ao nuôi thủy sản, cũng như trên động vật thủy sản bị nhiễm bệnh hay khoẻ mạnh (Araújo và cs., 2021). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về bệnh do vi khuẩn *E. faecalis* trên động vật thủy sản nuôi tại Việt Nam.

Kháng sinh được dùng phổ biến trong điều trị bệnh do vi khuẩn gây ra trên động vật thủy sản, mặc dù việc sử dụng kháng sinh tạo ra nhiều hiệu ứng không mong muốn như: gia tăng các chủng vi sinh vật kháng kháng sinh, ô nhiễm môi trường nước và đất, ngoài ra tồn dư kháng sinh làm ảnh hưởng đến an toàn thực phẩm (Novais và cs., 2018). Hiện nay, chưa có nhiều thông tin về khả năng miễn cảm kháng sinh của *E. faecalis* phân lập từ cá nuôi tại Việt Nam. Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu này nhằm tìm hiểu đặc điểm sinh học của các chủng *E. faecalis* phân lập từ cá chình bị bệnh nuôi tại tỉnh Quảng Bình, và đánh giá khả năng miễn cảm kháng sinh của các chủng *E. faecalis* phân lập được nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên

cứu sâu hơn về tác nhân gây bệnh này và làm tiền đề đưa ra các phương pháp phòng và trị bệnh hiệu quả để phát triển nghề nuôi cá chình tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm thu mẫu

Mẫu cá bệnh được thu trực tiếp tại 3 hộ nuôi cá chình (QB1, QB2 và QB3) tại huyện Lệ Thủy, tỉnh Quảng Bình, mỗi hộ thu 5 con cá có dấu hiệu bệnh lý xuất huyết lở loét ở vùng bụng, da cá tối sẫm, bơi lội chậm, nổi đầu. Cá thu được đóng trong túi nilon 15 L có sục khí và vận chuyển ở 15°C về phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế để phân tích mẫu. Những mẫu cá bệnh này được quan sát các dấu hiệu bệnh lý bên ngoài và dấu hiệu bệnh tích bên trong cơ thể trước khi nuôi cấy và phân lập vi khuẩn.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn từ mẫu bệnh phẩm

Phân lập vi khuẩn được tiến hành bằng cách dùng dao mổ đã được tiệt trùng bằng cồn 90°, mổ xoang bụng của cá, dùng que cấy nhựa tiệt trùng đâm thẳng vào thận rồi cấy lên môi trường Tryptone Soya Agar (TSA, HiMedia, Ấn Độ) đã được chuẩn bị sẵn. Dùng parafin bao kín lại và giữ ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ. Khuẩn lạc chiếm ưu thế được cấy chuyển lên môi trường TSA và môi trường Brilliant Group B Streptococcus (GBS) agar (Oxoid, Anh), ủ ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ để tạo dòng thuần cho những nghiên cứu tiếp theo.

2.3. Phương pháp định danh vi khuẩn

2.3.1. Phương pháp định danh vi khuẩn bằng phản ứng ngưng kết kháng nguyên

Kiểu huyết thanh được xác định bằng phương pháp ngưng kết miễn dịch theo phương pháp Lancefield (Lancefield, 1933) với bộ kit Strep-B-Latex (GBS) (Đan Mạch). Đầu tiên lấy hai giọt dung dịch

latex (khoảng 10 µL/giọt) nhỏ lên giấy thử theo từng nhóm A, B, C, D, F, G. Dùng que cấy tiệt trùng lấy khoảng từ 3-5 khuẩn lạc cho vào 3 mL nước muối sinh lý, sau đó cho 100 µL dung dịch phân giải vào và ủ ở nhiệt độ 55 °C trong 10 phút ở nồi cách thủy, tiếp theo nhỏ một giọt dung dịch vi khuẩn lên các nhóm A, B, C, D, F và G tương ứng. Dùng tăm tiệt trùng trộn đều 2 dung dịch. Phản ứng dương tính sẽ có ngưng kết xuất hiện trong 5 – 10 giây. Vi khuẩn Enterococcus cho phản ứng ngưng kết ở nhóm D, còn các loài vi khuẩn Streptococcus cho phản ứng ngưng kết ở các nhóm còn lại.

2.3.2. Phương pháp định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA

DNA của các chủng vi khuẩn phân lập được trích ly bằng DNA preparation Kit (SolGent, Korea), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') để khuếch đại gen 16S rRNA ở máy Thermal Cycler Dice® Gradient (Takara, Shiga, Nhật Bản) (Rizkiantino và cs., 2020). Hỗn hợp phản ứng PCR được tiến hành gồm DNA của chủng vi khuẩn đã được trích ly, 0.5 mM mỗi đoạn mồi, 1U Taq polymerase (Takara, Shiga, Nhật Bản), 100 mM dNTPs, và 2.5 mM MgCl₂. Các mẫu được xử lý nhiệt ở 95 °C trong 3 phút và sau đó được khuếch đại với 35 chu kỳ nhiệt gồm 95°C trong 30 giây, 50°C trong 30 giây, và 72°C trong 60 giây; cuối cùng là 72°C trong 5 phút (Rizkiantino và cs., 2020). Sản phẩm sau khi khuếch đại được chạy điện di trên 1% agarose gel và DNA được quan sát dưới đèn UV sau khi nhuộm ethidium bromide. Sản phẩm sau khi khuếch đại được tinh sạch bằng DNA clean up system (Bioneer, Daejeon, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó được giải trình tự nucleotide tại phòng thí

nghiệm Head Diagnostics institute Manufacturing Center, Biochemical Research Institute (Hàn Quốc).

So sánh sự giống nhau của gen 16S rRNA giữa các chủng vi khuẩn được thực hiện bằng phần mềm Basic Local Alignment Search Tool program (BLAST) trên trang National Center for Biotechnology Information (NCBI). Trình tự các acid nucleic của gen 16S rRNA được hiệu chỉnh bằng phần mềm Clustal W2 editor trên trình duyệt www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/.

Phân tích quan hệ gần gũi giữa các chủng phân lập được thực hiện bởi công cụ PHYLIP theo Saitou và Nei (1987). Cây phả hệ được xác định bằng phần mềm MEGA 7.0 (Kumar và cs., 2016; Tamura và cs., 2013) xử lý bootstrap với 1000 lần lặp.

2.4. Phương pháp xác định đặc điểm sinh hoá

Các phản ứng cơ bản gồm có: nhuộm Gram, oxidase, khả năng di động và phản ứng catalase được tiến hành theo phương pháp của Devriese và cs. (1993). Các phản ứng sinh hoá khác như phát triển trong môi trường TSB + 6.5% NaCl, khả năng dung huyết trên môi trường thạch chứa 5% máu cừu được tiến hành trên môi trường thương mại của công ty Nam Khoa (Việt Nam). Đặc điểm sinh hoá của các chủng vi khuẩn được xác định bằng API 20 Strep kit (BioM'erieux, Mỹ). Các tấm API 20 Strep kit được bổ sung dung dịch vi khuẩn với nồng độ 10^5 cfu/mL theo hướng dẫn của công ty và đọc kết quả sau 2 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C.

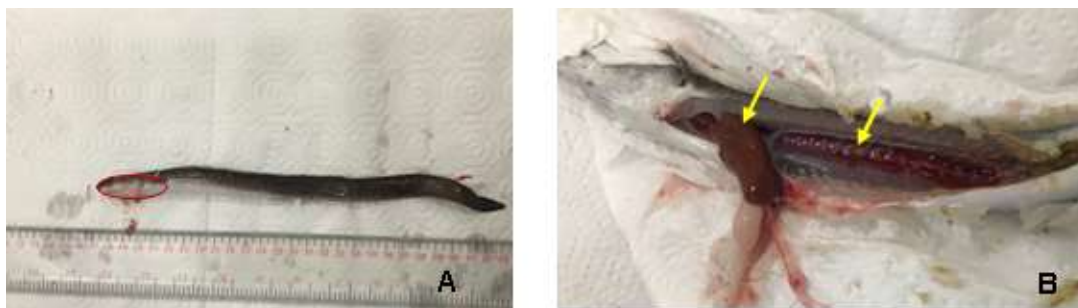
2.5. Phương pháp xác định sự miễn cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập được

Sự miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo phương pháp của Bauer và cs. (1966). Dùng que cấy tiệt trùng lấy khuẩn lạc trên đĩa vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 10 mL nước muối sinh lý (0,86% NaCl) đã tiệt trùng. Trộn đều và xác định mật độ vi khuẩn tương đương với dung dịch McFarland 0.5 (mật độ vi khuẩn 10^8 cfu.mL⁻¹). Sau đó, lấy 100 µL huyền phù vi khuẩn cấy trên môi trường Mueller Hinton Agar (MHA, Himedia, Ấn độ), để khô khoảng 10 phút, đặt các khoanh giấy có tẩm các loại kháng sinh ampicillin (10 µg), oxytetracycline (30 µg), tetracycline (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), penicillin (10 µg), và ciprofloxacin (5 µg) (Nam Khoa, Việt Nam) lên đĩa thạch, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C. Tiến hành đo đường kính vòng vô khuẩn sau 24 giờ. Đánh giá khả năng nhạy cảm hay kháng kháng sinh của vi khuẩn dựa trên dựa trên đường kính vòng vô khuẩn theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn bằng kết quả ngưng kết kháng nguyên

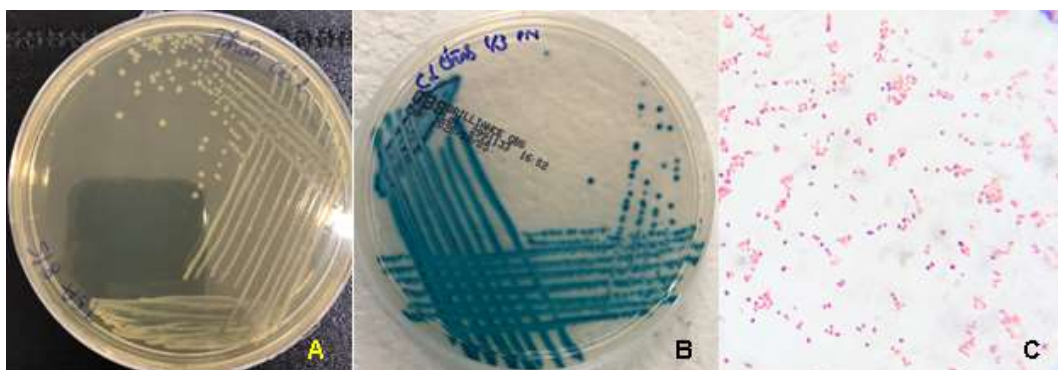
Trong 15 mẫu cá chình hoa có biểu hiện bơi lơ đờ, hoạt động chậm chạp, kém linh hoạt, da cá có màu tối sẫm, có 2 mẫu cá có dấu hiệu xuất huyết ở nắp mang (hình 1A). 10 mẫu cá có dấu hiệu gan và thận sưng to, ruột không có thức ăn (Hình 1 B). Xuất hiện hiện tượng xung huyết ở gan, thận và lách. Xoang bụng chứa nhiều dịch nhầy.



Hình 1. Cá chình hoa có dấu hiệu xuất huyết ở xương nắp mang (vòng tròn, A), gan, thận sưng to và xung huyết (mũi tên, B)

Từ 15 mẫu cá chình bị bệnh nuôi tại các trại cá ở huyện Lệ Thủy, tỉnh Quảng Bình khi nuôi cấy trên môi trường TSA đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn ở những cá có dấu hiệu xuất huyết ở nội quan. Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được đều tạo ra 1 dạng khuẩn lạc thuần, có dạng tròn đều, màu

trắng sữa trên môi trường TSA (Hình 2A). Tất cả các chủng tạo khuẩn lạc màu xanh trên môi trường Brilliant GBS Agar (Hình 2B). Các chủng vi khuẩn đều có dạng hình cầu, bắt màu tím khi nhuộm Gram, cho thấy đây là những cầu khuẩn Gram dương.



Hình 2. Khuẩn lạc tròn, đều, màu trắng trên môi trường TSA (A), màu xanh trên môi trường Brilliant GBS và vi khuẩn có dạng hình cầu, bắt màu tím của thuốc nhuộm Gram (C).

Kết quả phân lập và định danh bằng phản ứng ngưng kết kháng nguyên của 10

chủng vi khuẩn từ thận của các mẫu cá chình bệnh được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định danh bằng phản ứng ngưng kết kháng nguyên của hệ thống phân nhóm Lancefield từ các mẫu cá bệnh tại Quảng Bình

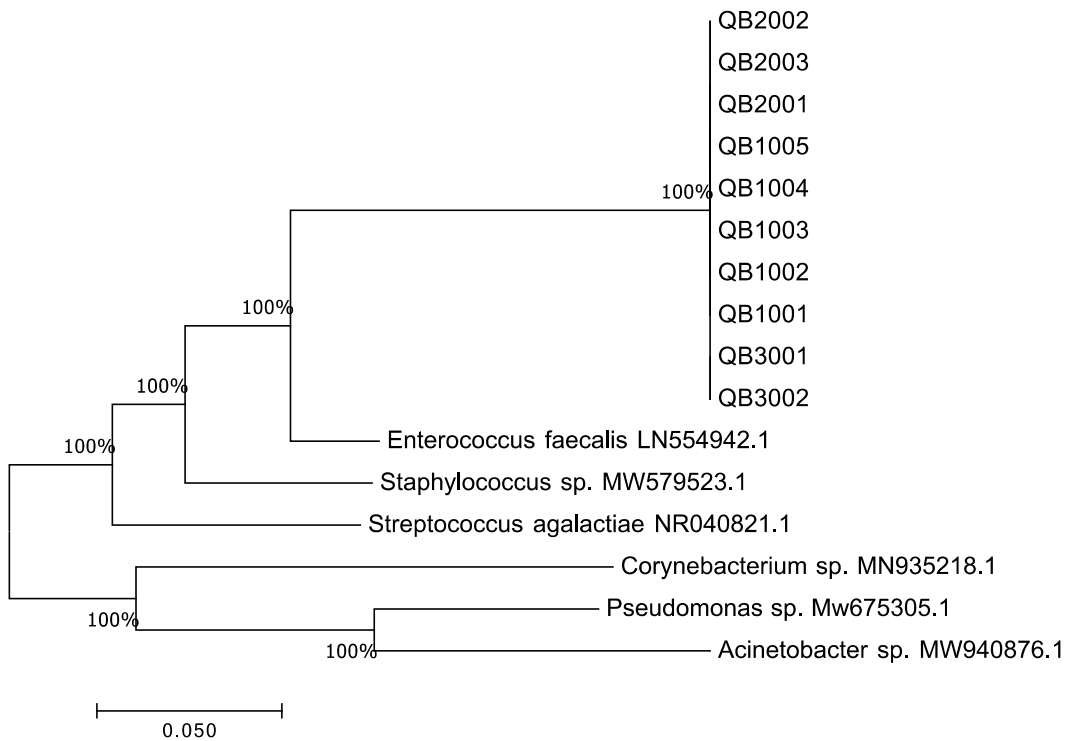
Hộ	Mẫu thu	Phân nhóm Lancefield	Kết quả định danh
1	QB1001	Nhóm D	Enterococcus QB1001
	QB1002	Nhóm D	Enterococcus QB1002
	QB1003	Nhóm D	Enterococcus QB1003
	QB1004	Nhóm D	Enterococcus QB1004
	QB1005	Nhóm D	Enterococcus QB1005
2	QB2001	Nhóm D	Enterococcus QB2001
	QB2002	Nhóm D	Enterococcus QB2002
	QB2003	Nhóm D	Enterococcus QB2003
3	QB3001	Nhóm D	Enterococcus QB3001
	QB3002	Nhóm D	Enterococcus QB3002

Phản ứng ngưng kết kháng nguyên Lancefield là một hệ thống phân loại cầu khuẩn Gram dương, catalase âm tính dựa trên thành phần carbohydrate của kháng nguyên vi khuẩn được tìm thấy trên thành tế bào của chúng. Kết quả cho thấy có 10/10 chủng vi khuẩn (chiếm 100%) cho phản ứng ngưng kết kháng nguyên ở nhóm D, từ đó 10 chủng này thuộc chi cầu khuẩn *Enterococcus*, nhưng chưa định danh được đến loài.

3.2. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S-rRNA

Các chủng vi khuẩn được định danh bằng phương pháp phân tích gen mã hóa 16S – rRNA, kết quả mã hoá trình tự axit nucleic và phân tích trên phần mềm BLAST được trình bày ở Hình 3.

Kết quả cho thấy: 10/10 chủng vi khuẩn phân lập trên cá chình hoa có trình tự nucleotide giống đến 100% so với đoạn gen 16S rRNA của chủng *Enterococcus faecalis* LN554942. Từ kết quả trên cho phép kết luận 10 chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu cá chình nuôi tại Quảng Bình là *Enterococcus faecalis*.



Hình 3. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự một phần của gen 16S rRNA của 10 chủng vi khuẩn phân lập được và vùng tương ứng ở đoạn gen 16S rRNA của chủng *Enterococcus faecalis* LN554942. Các số ở các nhánh biểu thị tỷ lệ phần trăm trùng khớp. Tỷ lệ ở phía dưới biểu thị khoảng cách tiến hóa của các nucleotide thay thế trên mỗi vị trí.

Vi khuẩn *E. faecalis* là nhóm cầu khuẩn Gram dương, sống phổ biến trong hệ thống tiêu hoá ở người, trước đây được phân loại là *Streptococcus* nhóm D, và cũng là loài gây bệnh trên cá nuôi trên thế giới (Nieto và cs., 1995; Rahman và cs., 2017;

Novais và cs., 2018; Rizkiantino và cs., 2020). Các yếu tố môi trường như nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến khả năng gây bệnh của nhóm liên cầu khuẩn trên cá (Rizkiantino và cs., 2020; Phuoc và cs., 2021) và gần đây *E. faecalis* được xem là

tác nhân gây bệnh phổ biến trên cá nuôi nhiệt đới (Rahman và cs., 2017; Rizkiantino và cs., 2020). Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào phân lập *E. faecalis* trên cá nuôi tại Việt Nam. Nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên phân lập được *E. faecalis* từ những mẫu cá chình bị bệnh nuôi tại tỉnh Quảng Bình nói riêng và tại Việt Nam nói chung, các nghiên cứu trước đây về liên cầu khuẩn gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt tại Việt Nam chỉ báo cáo về vi khuẩn *Streptococcus* (Đổng Thanh Hà và cs., 2013; Phạm Hồng Quân và cs., 2013; Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2015). Sự phát hiện này cung cấp cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu sâu hơn về *E. faecalis* gây bệnh trên cá nuôi tại Việt Nam.

3.3. Một số đặc điểm sinh hoá của các chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis*

Đặc điểm sinh hoá của 10 chủng *E. faecalis* phân lập được trên cá chình tại tỉnh Quảng Bình khá đồng nhất về mặt sinh hoá (Bảng 2). Tất cả các chủng đều cho phản ứng oxidase và catalase âm tính, đều phát triển được trên môi trường TSB có bổ sung 6.5% NaCl. Tất cả các chủng đều là cầu khuẩn, không tan huyết trên thạch máu cừu và không di động. Tất cả các chủng đều kháng với polymixin và optochin và đều có khả năng lên men với các loại đường như D-sorbitol, D-ribose, D-maltose, D-manose và D-trehalose (Bảng 2). Đặc điểm sinh hoá của các chủng *E. faecalis* trong nghiên cứu này giống với đặc điểm sinh hoá của các chủng *E. faecalis* gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại Malaysia (Rahman và cs., 2017) và Indonesia (Rizkiantino và cs., 2020).

Bảng 2. Đặc điểm sinh hoá của các chủng *Enterococcus faecalis*

Chi tiêu	Tỷ lệ % của 10 chủng vi khuẩn phân lập	
	Dương tính	Âm tính
Nhuộm Gram	100	0
Hình thái		Hình cầu
Di động		Không
Khả năng tan huyết		100 (γ)
Oxidase		100
Catalase		100
D-Amygdalin	100	
Phosphatidylinositol Phospholipase C		100
D-Xylose		100
Beta-Galactosidase		100
Arginine Dihydrolase 1		100
Alpha-Glucosidase		100
Ala-Phe-Pro Arylamidase	100	
L-Proline Arylamidase		100
Polymixin B Resistance	100	
D-Sorbitol	100	0
Lactose		100
D-Ribose	100	
D-Maltose	100	
D-Trehalose	100	
D-Rafinose		100
D-Manitol	100	0
D-Manose	100	0
Salicin	100	
Optochine Resistance	100	
Urease	10	90
TSB 6.5% NaCl	100	

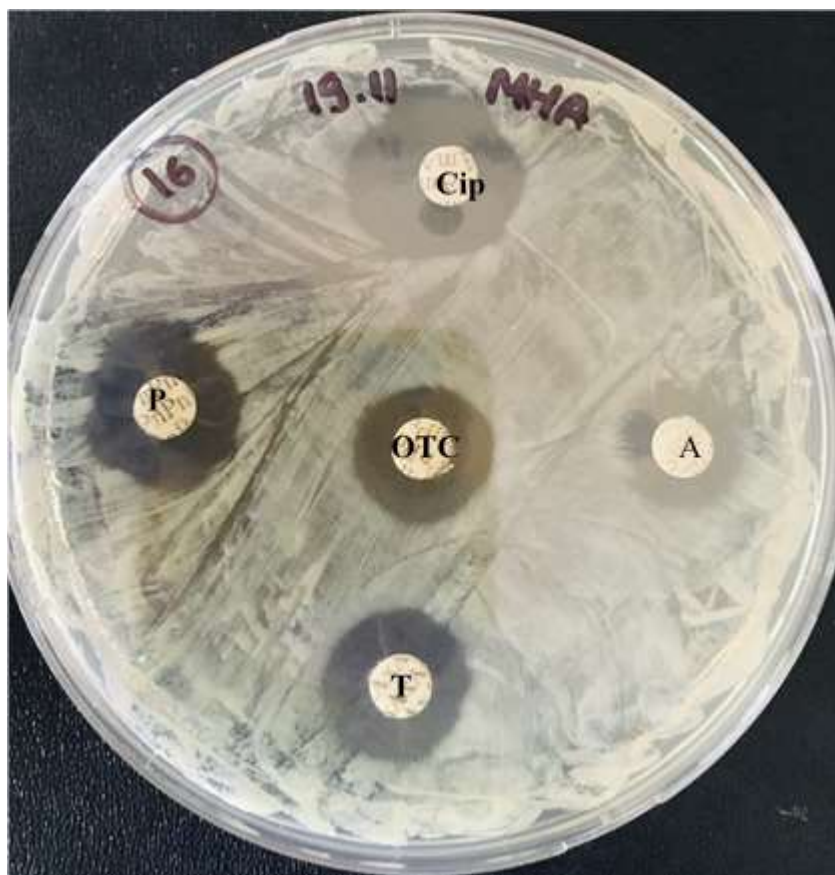
3.4. Khả năng nhạy cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis*

Kết quả thử khả năng nhạy cảm kháng sinh cho thấy gentamycin, penicillin, erythromycin và ciprofloxacin nhạy với các chủng *E. faecalis* (Hình 3, Bảng 3), cho thấy 4 loại kháng sinh này là những loại ít sử dụng trong nuôi cá chình tại tỉnh Quảng Bình, trong đó ciprofloxacin không được phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Ngược lại, cả 10 chủng *E. faecalis* phân lập được đều kháng với tetracycline và oxytetracycline, 80% số chủng kháng với ampicillin (Bảng 3). Kết quả này cho thấy 3 loại kháng sinh tetracycline, oxytetracycline và ampicillin được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản tại tỉnh Quảng Bình. Điều này phù hợp với kết quả của Rizkiantino và cs. (2020) khi nghiên cứu mối tương quan giữa việc sử dụng kháng sinh và tỷ lệ kháng thuốc cho thấy

mức độ sử dụng một loại kháng sinh cao sẽ làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh đó. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả của Osman và cs. (2017) khi nghiên cứu khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Enterococcus* gây bệnh trên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nuôi tại Ai Cập. Trong nghiên cứu này, 100% chủng kháng với tetracycline, 17% chủng kháng ciprofloxacin và tất cả các chủng đều nhạy với penicillin và gentamycin. Tuy nhiên, các chủng *E. faecalis* khi phân lập trên cá rô phi nuôi tại Indonesia và Malaysia thì đều kháng với ampicillin và penicillin (Rizkiantino và cs., 2020; Rahman và cs., 2017). Khi nghiên cứu về khả năng kháng kháng sinh của nhóm liên cầu khuẩn gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên Huế, Nguyễn Ngọc Phước và cs. (2019) cũng phát hiện hơn 60% chủng *Streptococcus* kháng với tetracycline và ampicillin và 100% chủng nhạy với penicillin.

Bảng 3. Sự mẫn cảm đối với 7 loại kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập được

Loại kháng sinh	Đường kính vòng vô khuẩn (mm) và tỷ lệ % của 10 chủng <i>Enterococcus faecalis</i> (Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn)	
	Nhạy cảm	Kháng
Gentamycin (10 µg)	10 ± 0,5 (100%)	0
Ampicillin (10 µg)	17 ± 0,00 (20%)	10 ± 0,5 (80%)
Tetracycline (30 µg)	0	20 ± 0,5 (100%)
Penicillin (10 µg)	15,5 ± 0,5 (100%)	0
Ciprofloxacin (5 µg)	21 ± 1,00 (90%)	13 ± 0,5 (10%)
Oxytetracycline (30 µg)	0	22,5 ± 0,5 (100%)
Erythromycin (15 µg)	24 ± 0,50 (100%)	0



Hình 3. Đường kính vòng vô khuẩn của một số loại kháng sinh A: ampicillin, OTC: oxytetracycline, T: tetracycline, P: penicillin, Cip: ciprofloxacin

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 10 chủng *Enterococcus* trên 15 mẫu cá chình nuôi tại tỉnh Quảng Bình. Các chủng này đều là cầu khuẩn Gram dương, không di động và cho phản ứng oxidase và catalase âm tính. Các chủng phân lập được tạo khuẩn lạc hình tròn, màu trắng trên môi trường TSA và màu xanh trên môi trường Brilliant GBS agar, tạo phản ứng ngưng kết Lancefield nhóm D. Kết quả định danh cho thấy 10/10 chủng vi khuẩn *Enterococcus* là *E. faecalis* với đặc điểm sinh hoá khá đồng nhất. Các chủng *E. faecalis* phân lập được trên cá chình nuôi tại Quảng Bình nhạy cảm với các loại kháng sinh gentamycin, penicillin, erythromycin và ciprofloxacin. Đây là nghiên cứu đầu tiên về *E. faecalis*

phân lập được trên cá chình nói riêng và cá nuôi tại Việt Nam nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- Đông Thanh Hà, Nguyễn Viết Khuê và Nguyễn Thị Hạnh. (2010). Một số đặc điểm của *Streptococcus agalactiae*, tác nhân gây bệnh Streptococcosis trên cá rô phi ở miền Bắc Việt Nam. Báo cáo khoa học - Trung tâm nghiên cứu quan trắc cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh thủy sản miền Bắc – Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy Sản I.
- Nguyễn Ngọc Phước, Lưu Thị Ngọc Hạnh, Nguyễn Thị Sao, Nguyễn Đức Quỳnh Anh, Trương Thị Hoa và Lê Văn Bảo Duy. (2015). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh hoá vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học – Đại học Huế*, 104(05), 207-219.
- Nguyễn Ngọc Phước, Trần Thị Nhật Anh, Nguyễn Thị Huệ Linh. (2019). Phân lập và

- xác định một số đặc điểm sinh học các chủng *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 3(3), 1591-1601.
- Phạm Hồng Quân, Hồ Thu Thủy, Nguyễn Hữu Vũ, Huỳnh Mỹ Lệ và Lê Văn Khoa. (2013). Một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí khoa học và phát triển*, 11(4), 506 - 513.
- Từ Thanh Dung, Lý Văn Khánh, Trần Ngọc Hải (2014). Xác định một số mầm bệnh trên cá chình bông (*Anguilla marmorata*) nuôi trong bể. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Thủy sản 2*, 177-183.
- 2. Tài liệu tiếng nước ngoài**
- Ahmed, M. E., & El-Refay. (2013). Studies on major bacterial diseases affecting fish; Tilapia *Oreochromis niloticus*, Catfish, *Clarias gariepinus* and mullets in Port Said, Egypt with special references to its pathological alterations. *Researcher*, 5, 5-14.
- Araújo, A. J. G., Grassotti, T. T & Frazzon, A. P. G. (2021). Characterization of *Enterococcus* spp. isolated from a fish farming environment in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 954-961.
- Austin, B., & Austin, D.A. (2012). Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. 5th ed. London, The United Kingdom: *Springer Science and Business Media Dordrecht*.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., & Sherris, J. C. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. USA (Pennsylvania): *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Devriese, L. A., Pot, B., & Collins, M. D. (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 399-408.
- Eman, Z., Ahmed, M. H, Abdelhamid, F., Sadeyen, J. R, & Risha, E. (2019). Experimental pathogenesis and host immune responses of *Enterococcus faecalis* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 521, 734319.
- Khafagy, A. A. R., Eid, H. M. I., Abou El- Atta, M. E. I., & El-Fattah, L. S. (2009). Isolation of *Enterococcus faecalis* from tilapia in lake Temsah in Ismailia Governorate. *SCVMJ*, 14(2), 45-54.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, msw054.
- Kusuda, R., & Salati, F. (1993). Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 69-85.
- Lancefield, R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, 57(4), 571-595.
- Nieto, J., Devesa, S., Quiroga, I., & Toranzo, A. (1995). Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Diseases*, 18, 21-30.
- Novais, C., Campos, J., Freitas, A.R., Barros, M., Silveira, E., Coque, T.M., Antunes, P., & Peixex, L. (2018). Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. *The Science of the Total Environment*, 625, 1102-1112.
- Osman, K. M., Al-Maary, K. S., Mubarak, A. S., Dawoud, T.M., Moussa, I. M. I., Ibrahim, M. D. S., Hessain, A. M., Orabi, A., & Fawzy, N. M. (2017). Characterisation and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicaemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 357.
- Petersen, A., & Dalsgaard, A. (2003). Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture*, 219, 71-82.
- Phuoc, N., N., Linh, N.T H., Crestani, C., & Ruth N. Zadoks, R. N. (2021). Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae*

- (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 534, 736256
- Plumb, J., & Hanson, L. (2010). Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes, 3rd. *John Wiley & Sons*.
- Rahman, M., Deb, S. C., Alam, M.S., Alam, M. J., & Islam, M.T. (2017). Molecular identification of multiple antibiotic resistant fish pathogenic *Enterococcus faecalis* and their control by medicinal herbs. *Nature: Scientific Reports*, 7, 3747.
- Rizkiantino, R., Wibawan, I. W. T., Pasaribu, F. H., Soejoedono, R. D., Arnafia, W., Ulyama, V., & Wibowo, D. B. (2020). Isolation and characterisation of the *Enterococcus faecalis* strain isolated from red tilapia (*Oreochromis hybrid*) in Indonesia: A preliminary report. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 7(1), 27-42.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Thune, R. L., Stanley, L. A., & Cooper, R. K. (1993). Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 37 - 68.
- Yanong, R. P. E., & Francis-Floyd, R. (2002). Streptococcal Infections of Fish. <http://edis.ifas.ufl.edu>. Cited 04 Apr 2021.