

KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH MÀNG SINH HỌC VÀ TÍNH KHÁNG KHÁNG SINH CỦA *Vibrio parahaemolyticus* PHÂN LẬP TỪ TÔM HÙM *Panulirus* spp. NUÔI

Văn Hồng Cẩm^{1*}, Phạm Thị Thu Hằng⁴, Nguyễn Thị Anh Thư¹, Đoàn Vũ Thịnh³, Lê Thành Cường²

¹ Viện Công nghệ sinh học và môi trường, Trường Đại học Nha Trang

² Viện Nuôi trồng Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

³ Khoa Công nghệ thông tin, Trường Đại học Nha Trang

⁴ Sinh viên Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nha Trang

TÓM TẮT

Tôm hùm là động vật thủy sản có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, nghề nuôi tôm hùm luôn đối mặt với các đợt dịch bệnh gây thiệt hại nặng nề cho người nuôi. Nghiên cứu này tập trung vào việc phân lập, định danh, xác định tính kháng kháng sinh và khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) của các chủng *Vibrio parahaemolyticus* từ các mẫu tôm hùm bông *Panulirus ornatus* và tôm hùm xanh *Panulirus hormarus* được nuôi trong các lồng bè khu vực Bình Ba, tỉnh Khánh Hòa. Kết quả định danh bằng phương pháp hóa sinh và sinh học phân tử (xác định sự có mặt của gene *toxR* bằng cặp mồi chuyên biệt loài) cho thấy *V. parahaemolyticus* xuất hiện trong tất cả các mẫu tôm kiểm định ($n = 30$). Các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được thể hiện tính kháng cao đối với kháng sinh Streptomycin (67%) và Cefotaxime (33%); nhạy cảm cao đối với kháng sinh Florfenicol (100%) và Trimethoprim Sulphamethoxazole (100%). Đối với khả năng hình thành màng sinh học (biofilm), kết quả nghiên cứu cho thấy có 83% các dòng vi khuẩn có khả năng sinh biofilm. Phân tích mối tương quan giữa khả năng sinh biofilm và tính kháng kháng sinh cho thấy các chủng vi khuẩn đa kháng (hoặc đa nhạy trung bình) có khả năng hình thành màng sinh học mạnh.

Từ khóa: Hình thành màng sinh học, kháng kháng sinh, *Panulirus* spp., *V. parahaemolyticus*.

MỞ ĐẦU

Vibrio spp. là các vi sinh vật có liên quan mật thiết đến nhiều bệnh khác nhau trên động vật và con người. Đặc biệt, các *Vibrio* có mang các yếu tố độc lực là nhóm vi khuẩn gây ảnh hưởng lớn đến ngành nuôi trồng thủy sản. Ở các vùng nuôi thủy sản nhiệt đới, dịch bệnh bùng phát đa số gắn liền với các nhóm *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. campbellii*. Trong đó, *V. parahaemolyticus* là loài vi khuẩn được biết đến với khả năng gây nhiều bệnh khác nhau và nguy hiểm trên đối tượng thủy sản.

Một số sản phẩm ngoại bào do *Vibrio* tiết ra được cho là có khả năng đóng góp vào tính độc của dòng vi khuẩn này bao gồm: sự có mặt của độc tố *toxR*, hemolysins (phân giải hồng cầu), phospholipase, siderophores, cytotoxins, chất bám dính (adhesin), khả năng hình thành màng sinh học (biofilm formation), quorum sensing (khả năng giao tiếp), khả năng di động nhanh (swarming), khả năng kháng kháng sinh... Nhiễm độc *Vibrio* xuất hiện do sự có mặt của một hoặc tổ hợp nhiều nhân tố gây độc lực nói trên (Mohamad *et al.*, 2019).

Biofilm là một tập hợp gồm nhiều tế bào vi sinh vật gắn kết với nhau trên bề mặt một giá thể. Biofilm có vai trò bảo vệ các loài vi sinh vật chống lại tác động của các yếu tố bất lợi của môi trường sống như thiếu các chất dinh dưỡng, tác dụng của chất kháng sinh... Sự hình thành biofilm là một cơ chế gây độc lực quan trọng ở các dòng vi khuẩn gây bệnh và đã được phát hiện ở các vi khuẩn khác nhau bao gồm *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Vibrio parahaemolyticus* (Chen *et al.*, 2018; Verderosa *et al.*, 2019). Gần đây, kết quả nghiên cứu của Ashrafudoulla và đồng tác giả (2019) trên các dòng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập từ vẹm xanh đều mang gene độc tính và tính đa kháng và khả năng hình thành màng sinh học.

Trong thời gian trở lại đây, kháng kháng sinh ở các dòng *Vibrio* spp. trong nuôi trồng thủy sản vẫn chưa có dấu hiệu giảm. Ngoài ra, tình trạng đa kháng kháng sinh ở các dòng *Vibrio* mang độc tính như *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* gây ra thất bại nghiêm trọng trong nuôi trồng thủy sản (Mohamad *et al.*, 2019).

Nghiên cứu này tập trung vào việc xác định tính kháng kháng sinh, khả năng hình thành biofilm của các vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập từ tôm hùm *Panulirus* nuôi biển.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu mẫu tôm

15 mẫu tôm hùm xanh (*Panulirus hormarus*) và 15 mẫu tôm hùm bông (*Panulirus ornatus*) còn sống, có dấu hiệu bỏ ăn, toàn thân đỏ ửng được thu thập tại các lồng bè nuôi ở khu vực đảo Bình Ba, Cam Ranh, Khánh Hòa, tôm được đóng trong các thùng xốp có sục khí. Các mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm phục vụ cho việc phân tích. Thời gian thực hiện nghiên cứu: 2/2018 - 10/2019.

Phân lập và định danh *Vibrio parahaemolyticus* bằng phương pháp vi sinh, hóa sinh

Phân lập vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được thực hiện theo phương pháp của López-León và đồng tác giả (2016) có cải tiến: đồng nhất mẫu ruột tôm trong môi trường ASPW (Alkaline peptone water, Himedia) và tăng sinh chọn lọc trong 24h $\pm$ 2h, 28°C $\pm$ 2°C. Dịch tăng sinh sau đó được cấy ria trên môi trường TCBS (Thiosulphate citrate bile sucrose, Himedia, Ấn Độ) 24h $\pm$ 2h, 28°C $\pm$ 2°C. Các khuẩn lạc điển hình của *Vibrio parahaemolyticus* (bóng tròn, đường kính 2-3 mm, xanh lá thẫm) rời rạc được làm thuần trên môi trường NA (nutrient agar, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2,5% NaCl. Các đặc điểm sinh hóa khẳng định *Vibrio parahaemolyticus* bao gồm nhuộm string test, nhuộm Gram, test di động, lên men các đường Glucose, Lactose, Sucrose, khả năng sinh H₂S, sinh hơi, oxidase, Ornithine decarboxylase ODC, Lysine decarboxylase LDC, Arginine dihydrolase (ADH), Indol, NaCl 0%, NaCl 2%, NaCl 6%, NaCl 8%, NaCl 10% (Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7905-1:2008). Các chủng vi khuẩn thuần được bảo quản trên ống thạch nghiêng (4°C) và cấp đông -70°C trong glycerol 15%.

Xác định gene độc tố toxR của *Vibrio parahaemolyticus* bằng kỹ thuật PCR

Các mẫu nuôi cấy vi khuẩn thuần (sau khi xác định các đặc điểm sinh hóa, vi sinh) được kích hoạt trên môi trường Nutrient Broth (NB) có bổ sung 1,5% NaCl, 28°C $\pm$ 2°C, 12-15h và được sử dụng để tách chiết DNA tổng số. Quy trình tách chiết DNA tổng số (TNA) được thực hiện như sau: 1,5 mL dịch khuẩn trong môi trường NB được hút vào eppendorf và li tâm 8000 rpm trong 10 phút. Cặn thu được ủ trong 200 μ L dung dịch phân giải (gồm 7,8 M urea, 0,5% sodium dodecyl sulphate) ở 55°C trong 10 phút, sau đó ủ trên đá trong 10 phút. Sau khi thêm 100 μ L of 7,5 M ammonium acetate, hỗn hợp được vortex trong 30 giây ở nhiệt độ phòng và ly tâm với tốc độ 14.000 vòng trong 5 phút ở 4°C. Tiếp theo, bổ sung 300 μ L isopropanol vào dịch nổi thu được và lắc 40 lần, hỗn hợp được ly tâm ở 16.000g trong 10 phút. Cuối cùng, rửa cặn thu được bằng ethanol 60% 2 lần và hòa tan cặn bằng 50 μ L nước cất (molecular grade water).

Đoạn gene toxR được khuếch đại trong hỗn hợp phản ứng gồm 5 μ L 5X My Taq reaction buffer, 0,5 μ L My Taq polymerase (Bioline,), 0,5 μ L mỗi toxR-F (5'-3') GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG, 0,5 μ L toxR-R (5'-3') ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG (Kim *et al.* 1999) có nồng độ 10 pmoles/ μ L, 2 μ L TNA vi khuẩn, và 16,5 μ L nước. Phản ứng khuếch đại đoạn gene toxR được thực hiện trên máy luân nhiệt (Biorad) với các bước như sau: 95°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kì gồm 95°C trong 30 giây, 50°C trong 30 giây, và 72°C trong 30 giây, cuối cùng là 72°C trong 5 phút.

Sản phẩm khuếch đại gene toxR được điện di trên gel agarose 1% có nhuộm ethidium bromide (0,5 μ g/mL) và quan sát kết quả dưới đèn tia cực tím. Sản phẩm có kích thước khoảng 350bpS

Khả năng kháng kháng sinh của các dòng *Vibrio parahaemolyticus* phân lập được

Khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được thực hiện dựa theo nguyên lý phương pháp khuếch tán thạch của Bauer và đồng tác giả (1966) được sử dụng trong khảo sát kháng sinh trên đối tượng thú y (Watts *et al.*, 2018). Thí nghiệm kháng kháng sinh được tiến hành với 10 loại đĩa kháng sinh khác nhau phổ biến có tác dụng trên vi khuẩn Gram âm, hay được dùng trong thú y thủy sản hoặc dùng điều trị cho người bao gồm: AMK30 (Amikacin 30 μ g), CIP5 (Ciprofloxacin 5 μ g), CLR15 (Clarithromycin 15 μ g), CN10 (Gentamicin 10 μ g), CTX30 (Cefotaxime 30 μ g), E15 (Erythromycin 15 μ g), ERN5 (Enrofloxacin 5 μ g), FFC30 (Florfenicol 30 μ g), SXT25(1 trimethoprim 19 Sulphamethoxazole/ 25 μ g), S10 (Streptomycin 10 μ g). Môi trường Mueller Hinton Agar (MHA-Himedia, Ấn Độ) và các đĩa kháng sinh thương mại (Oxoid, UK) được sử dụng trong thực hiện kháng sinh đồ. Để đảm bảo chất lượng các lần thực hiện phương pháp khoan giấy kháng sinh khuếch tán, các chủng vi khuẩn chuẩn *E. coli* ATCC 25922 và *Staphylococcus* ATCC được sử dụng làm chứng tham chiếu (WHO, 2003 ; Watts *et al.*, 2018). Kết quả dựa theo bảng tra kết quả kích thước vòng vô khuẩn với tiêu chuẩn Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm (CLSI, 2019).

Khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) của các chủng *Vibrio parahaemolyticus* phân lập được và mối tương quan giữa tính sinh biofilm và tính kháng kháng sinh của các vi khuẩn

Để xác định khả năng hình thành biofilm của các chủng vi khuẩn, phương pháp nhuộm ống eppendorf bằng dung dịch tím tinh thể được áp dụng theo cách thức của Latorre và đồng tác giả (2016) có sửa đổi. Tóm tắt các bước thực hiện như sau: các chủng vi khuẩn từ ống glycerol -20°C được kích hoạt trong TSB 28°C $\pm$ 2°C, 24h. Điều chỉnh dịch nuôi cấy đạt McFarland 0,5 tương đương với $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (tương ứng OD₅₅₀ = 0,5). Hút 50 μ L dịch khuẩn cấy vào cốc chứa 0,5 mL môi trường TSB bổ sung 2,5% NaCl trong các ống eppendorf (thể tích ống 1,5 mL), chất liệu ống polypropylene. Dịch khuẩn được nuôi ở 28°C $\pm$ 2°C, không lắc. Sau 24h, nuôi cấy, phần dịch nuôi cấy được đổ bỏ, và các ống được rửa nhẹ nhàng bằng nước cất, để khô tự nhiên. Sau đó, 1 mL dung dịch crystal violet (tím tinh thể) 1% w/v (khối lượng/thể tích nước) được thêm vào các ống để nhuộm các tế bào bám trên thành ống. Sau 25 phút nhuộm, dung dịch tím tinh thể được loại bỏ, và các ống tiếp tục được rửa bằng nước cất và để khô. Khi các ống đã khô, thêm 1,5 mL C₂H₅OH 96% vào các ống để hòa tan thuốc nhuộm tím tinh thể, dung dịch hòa tan sau đó được đo OD₅₇₀ (Biorad).

Giá trị OD ngưỡng (cut-off value) ODC = $\overline{OD}_{nc}$ + 3SD trong đó $\overline{OD}_{nc}$ là giá trị OD trung bình của các mẫu đối chứng âm và SD là độ lệch chuẩn của các giá trị OD của các mẫu đối chứng âm. Giá trị OD của mẫu vi khuẩn kiểm định ODs = $\overline{OD}_s$ - ODC. Trong đó (i) nếu ODs $\leq$ ODC vi khuẩn kiểm định không hình thành biofilm ; (ii) nếu OD_c < ODs $\leq$ 2 $\times$ ODC vi khuẩn kiểm định hình thành biofilm yếu (+) ; (iii) nếu 2 $\times$ OD_c < OD $\leq$ 4 $\times$ ODC vi khuẩn

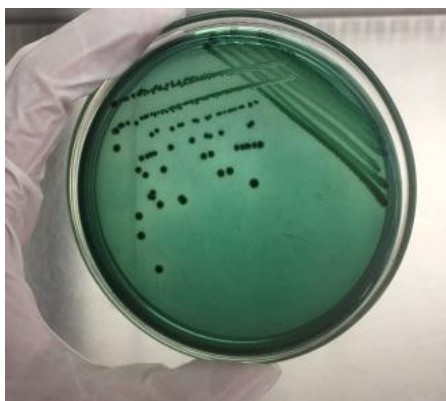
kiểm định hình thành biofilm trung bình (++) và (iv) nếu $4 \times OD_c < OD$ vi khuẩn kiểm định hình thành biofilm mạnh (+++).

Mối tương quan giữa khả năng hình thành biofilm và tính kháng kháng sinh của các chủng vi sinh vật được phân tích dựa trên thống kê đa biến phân tích thành phần chính PCA (Principal Component Analysis) (Pearson, 1901; Hotelling, 1933; Nguyễn Hữu Du, 2014) sử dụng phần mềm SPSS; trong đó các biến số lần lượt là số lượng kháng sinh của mỗi chủng được ghi nhận nhạy cảm, trung bình, kháng và OD của mẫu sau khi kiểm tra tính sinh biofilm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và định danh *Vibrio parahaemolyticus*

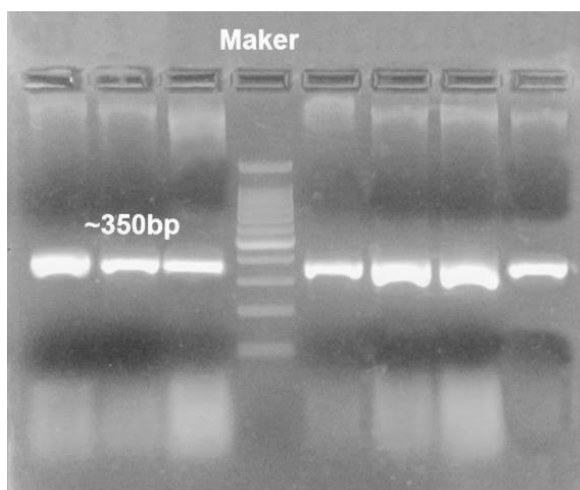
30 chủng *Vibrio parahaemolyticus* bao gồm 15 chủng mã hóa Vp_Ph1 → Vp_Ph15 được phân lập từ tôm hùm xanh (*Panulirus homarus*) và 15 chủng được mã hóa Vp_Po1 → Vp_Po15 được phân lập từ tôm hùm bông (*Panulirus ornatus*). Các chủng này có thể hiện các đặc điểm: Sucrose (-) (thể hiện khuẩn lạc xanh đậm trên môi trường TCBS – Hình 1), Gram -, di động (+), Glucose (+), Lactose (-), H₂S (-), sinh hơi (-), oxidase (+), Ornithine decarboxylase ODC (+), Lysine decarboxylase LDC (+), Arginine dihydrolase (ADH) (-), Indol (+), NaCl 0% (-), NaCl 2% (+), NaCl 6% (+), NaCl 8% (+), NaCl 10% (-). Tất cả các mẫu tôm hùm thu nhận đều có sự hiện diện của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*.



Hình 1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng *V. parahaemolyticus* trên TCBS

Xác định gene độc tố *toxR* của *Vibrio parahaemolyticus* bằng kỹ thuật PCR

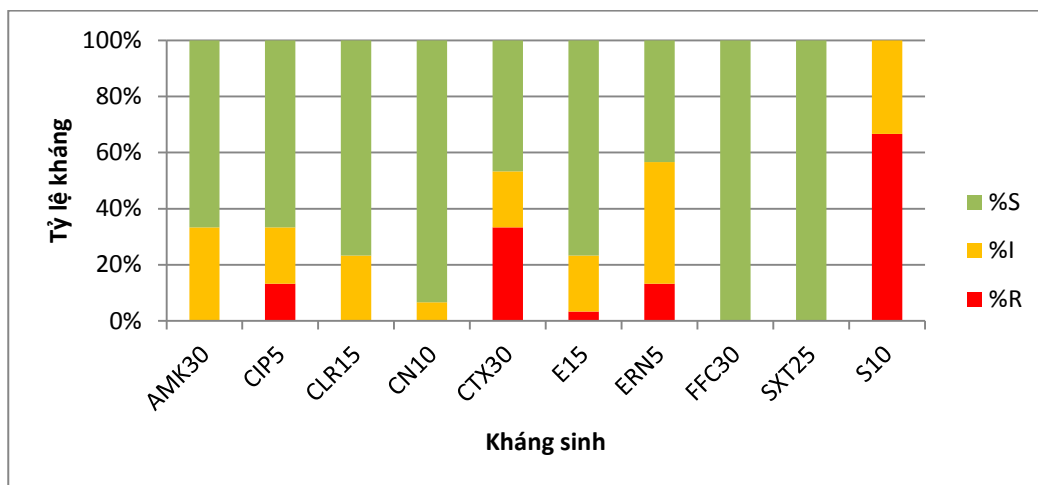
Các chủng *Vibrio parahaemolyticus* sau khi định danh sinh hóa, hình thái được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của gene *toxR* bằng cặp mồi đặc hiệu. Các sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% với thang Marker chuẩn có kích thước 1000bp. Đoạn gene *toxR* mục tiêu có kích thước khoảng 350bp (Hình 2). Tất cả 30 dòng *Vibrio parahaemolyticus* sau khi được định danh bằng phương pháp vi sinh, hóa sinh đều có mang gene *toxR*. Gene *toxR* có mặt trong tất cả các dòng *V. parahaemolyticus* (Kim et al., 1999), do vậy việc sử dụng đoạn gene *toxR*, song song với phương pháp sinh hóa, có thể được sử dụng trong định danh ở cấp độ loài.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen độc tố *toxR* của *V. parahaemolyticus*

Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Vibrio parahaemolyticus* phân lập được

Kết quả kháng sinh đồ cho thấy các chủng *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm hùm thể hiện tính kháng cao với Streptomycin (67%), Cefotaxime (33%), Enrofloxacin (13%). Tất cả các chủng đều nhạy cảm với Florfenicol (100%) và Trimethoprim Sulphamethoxazole (100%). Tỷ lệ các chủng nhạy trung bình với một số loại kháng sinh như Amikacin, Cefotaxime, Enrofloxacin khá cao, Streptomycin (> 20%) (Hình 3). Ngoài ra, có 6 chủng (20%) đa kháng với 2 loại kháng sinh và 5 chủng đa kháng với 3 loại kháng sinh (16,76%). Tất cả các trường hợp đa kháng đều có liên quan đến kháng Streptomycin. Và trong 30 chủng phân tích, tất cả các chủng đều kháng hoặc nhạy trung bình với Streptomycin.



Hình 3. Kết quả kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm hùm

AMK30 (Amikacin 30 µg), CIP5 (Ciprofloxacin 5 µg), CLR15 (Clarithromycin 15 µg), CN10 (Gentamicin 10 µg), CTX30 (Cefotaxime 30 µg), E15 (Erythromycin 15 µg), ERN5 (Enrofloxacin 5 µg), FFC30 (Florfenicol 30 µg), SXT25 (1 trimethoprim 19 Sulphamethoxazole/ 25 µg), S10 (Streptomycin 10 µg)

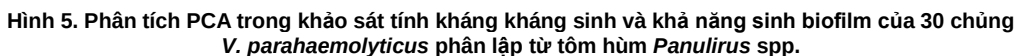
Khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) của các chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập được

Kết quả cho thấy các ống đối chứng âm (*Staphylococcus* ATCC25923) không bắt màu thuốc nhuộm crystal violet. Các ống nuôi cấy vi khuẩn bắt màu thuốc nhuộm với các cường độ khác nhau (Hình 4). Kết quả đo OD₅₇₀ dung dịch tím tinh thể sau khi hòa tan với Ethanol 96% cho kết quả 83% các dòng *V. parahaemolyticus* phân lập được trong nghiên cứu này đều có khả năng sinh biofilm trong đó 20% sinh biofilm yếu (+), 20% sinh biofilm ở mức trung bình và 33% sinh biofilm mạnh.



Hình 4. Khả năng sinh màng biofilm của các dòng *V. parahaemolyticus* trên chất liệu nhựa polypropylene

Phân tích thành phần chính PCA trên phần mềm SPSS cho thấy khả năng sinh biofilm và tính kháng kháng sinh có mối tương quan. Trong đó, các chủng sinh biofilm ở mức mạnh đa số đều đa kháng, hoặc đa nhạy trung bình (tổng số kháng sinh R và I ≥ 4). Ngược lại, các chủng không có khả năng sinh biofilm không kháng hoặc chỉ kháng với 1 loại kháng sinh và nhạy cảm với dưới 4 loại kháng sinh trong số 10 kháng sinh được khảo sát (Hình 5).



Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi khá phù hợp với các nghiên cứu khác về mối tương quan giữa tính kháng các loại kháng sinh và khả năng hình thành biofilm của các chủng vi khuẩn (Verderosa *et al.*, 2019; Ashrafudoulla *et al.*, 2019) cũng như khẳng định lần nữa tình trạng kháng kháng sinh tại các khu vực nuôi vẫn đang trong tình trạng báo động.

Ashrafudoulla M, Mizan MFR, Park H, Byun K-H, Lee N, Park SH and Ha S-D (2019). Genetic Relationship, Virulence Factors, Drug Resistance Profile and Biofilm Formation Ability of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated From Mussel, *Front Microbiol*10: 513. doi: 10.3389/fmicb.2019.00513.

CLSI (2019) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute susceptibility testing standards M02, M07, and M1.

Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene. *J Clin Microbiol* 37(4): 1173-1177.

Latorre J, Hernandez-Velasco X, Wolfenden R, Vicente-Salvador J, Wolfenden A, Menconi A, Bielke L, Hargis B, Tellez G (2016). Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Front Vet Sci* 3. doi: 10.3389/fvets.2016.00095.

López-León P, Luna-González A, Escamilla-Montes R, Flores-Miranda M del C, Fierro-Coronado JA, Píndaro Álvarez-Ruiz GD-P (2016) Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Latin Ame J Aqua Res* 44: 470-479.

Mohamad N, Amal MNA, Saad MZ, Yasin ISM, Zulkipli NA, Mustafa M, Nasruddin NS (2019). Virulence-associated genes and antibiotic resistance patterns of *Vibrio* spp. isolated from cultured marine fishes in Malaysia, *BMC Vet Res* 15(1): 176. doi: 10.1186/s12917-019-1907-8.

Nguyễn Hữu Du (2014). Phương pháp phân tích thành phần chính và phân tích cụm trong xử lí số liệu thống kê nhiều chiều. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(5): 762-768.

Pearson K (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosoph Mag Series 6* 2(11): 559-572.

Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7905-1:2008 (ISO/TS 21872-1:2007) về Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp phát hiện *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh đường ruột - Phần 1: Phát hiện *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholera*.

Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review, *Front Chem* 7: 824. doi: 10.3389/fchem.2019.00824.

Watts JL, Sweeney MT, Lubbers BV (2018). Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria of Veterinary Origin, *Microbiol Spec* 6(2). doi: 10.1128/microbiolspec.arba-0001-2017.

BIOFILM FORMATION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *Vibrio parahaemolyticus* ISOLATED FROM SEACAGE LOBSTER *Panulirus* spp.

Văn Hồng Cầm^{1*}, Phạm Thị Thu Hằng⁴, Nguyễn Thị Anh Thư¹, Đoàn Vũ Thịnh³, Lê Thành Cường²

¹ Institute for Biotechnology and Environment, Nha Trang University

² Institute for Aquaculture, Nha Trang University

³ Faculty of Information Technology, Nha Trang University

⁴ Student of Biotechnology, Nha Trang University

SUMMARY

Lobsters are aquatic animals with high economic value. However, lobster farming is always faced disease outbreaks causing heavy losses to farmers. This study focused on isolating, identifying, antibiotic resistance profile and the ability to form biofilm of *Vibrio parahaemolyticus* strains from *Panulirus ornatus* and *Panulirus hormarus* which are cultured in cages in Binh Ba area, Khanh Hoa province. Results of identification by biochemical and molecular biology methods (the presence of *toxR* gene by species-specific primer set) showed that *V. parahaemolyticus* appeared in all tested shrimp samples (n = 30). Isolated *V. parahaemolyticus* strains exhibited high resistance to Streptomycin (67%) and Cefotaxime (33%); High sensitivity to antibiotics Florfenicol (100%) and Trimethoprim Sulphamethoxazole (100%). About the possibility of biofilm formation, the study results revealed that 83% of the bacterial strains had ability to produce biofilm. Analysis of the correlation between biofilm formation and antibiotic resistance showed that strains which were multidrug-resistant (or intermediate) bacteria were able to form strong biofilms.

Keywords: Antibiotic resistance, biofilm formation, *Panulirus* spp., *V. parahaemolyticus*.

* Author for correspondence: Email: camvh@ntu.edu.vn