

ĐẶC ĐIỂM CỦA VI KHUẨN ĐA KHÁNG PHÂN LẬP TỪ CÁ RÔ ĐỒNG VÀ TIỀM NĂNG PHÒNG NGỪA BẰNG CÁC HỢP CHẤT TỰ NHIÊN

Nguyễn Thành Luân

Viện Khoa học Ứng dụng HUTECH, Đại học Công Nghệ Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, đặc điểm của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô đồng nghi nhiễm bệnh được khảo sát bao gồm mức độ mẫn cảm với các loại kháng sinh, độc lực gây chết cá, và hoạt tính kháng của các hợp chất chiết xuất từ thực vật đối với các chủng vi khuẩn phân lập được. Tổng số 30 chủng vi khuẩn, giống *Vibrio* (10 chủng) và non-*Vibrio* (20 chủng) được phân lập có biểu hiện kháng với 9 loại kháng sinh khảo sát. Có 11/12 chủng kháng với ít nhất 5 loại kháng sinh. Tất cả 12 chủng khảo sát đều nhạy cảm với ciprofloxacin, nhưng loại kháng sinh này hiện nay đã bị cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam và các chủng vi khuẩn này có thể gây chết cá rô đồng giống từ 40% đến 90% trong gây nhiễm thực nghiệm (10^5 CFU/con, i.p). Khảo sát hoạt tính của các hợp chất chiết xuất từ thực vật đối với các chủng vi khuẩn ở nghiên cứu này cho thấy 2 hợp chất TT1 và TT2 có hiệu quả kháng các chủng vi khuẩn (NV5M và V7L) có độc lực cao, gây chết cá. Kết quả trên cũng cho thấy rằng việc sử dụng kháng sinh để phòng và điều trị bệnh cho thủy sản ở Việt Nam cần phải được kiểm soát nghiêm ngặt hơn. Sử dụng các hợp chất chiết xuất từ thực vật thay thế kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản sẽ là liệu pháp an toàn. Nghiên cứu tiếp theo về phân tử (gen kháng kháng sinh, plasmid của vi khuẩn) cần được thực hiện nhằm tăng hiệu quả kiểm soát việc sử dụng kháng sinh, giảm thiểu ô nhiễm môi trường để bảo vệ sức khỏe con người.

Từ khóa: Cá rô đồng, độc lực, kháng kháng sinh, vi khuẩn *Vibrio*.

Characterization of multi-antibiotic resistant bacteria isolated from climbing perch (*Anabas testudineus*) and therapeutic potential of phytochemicals

Nguyen Thanh Luan

SUMMARY

This study was conducted to investigate the characteristics of bacteria isolating from the diseased climbing perches, including *in-vitro* antimicrobial susceptibility test and virulent examination. A total of 30 bacterial strains, including 10 strains of *Vibrio* and 20 strains of non-*Vibrio* were isolated in this study, they resisted to 9 experimental antibiotics. There were 11 out of 12 investigated strains resisted to at least five antibiotics. All of 12 these bacteria strains were susceptible to ciprofloxacin, but this antibiotic was presently prohibited to use in aquaculture in Viet Nam, and in the result of experimental infection for climbing perch fingerlings with the above bacteria strains with a dose of 10^5 CFU/fish showed that 12 these isolates caused mortality of fish with the rate varying from 40-90%. The result of testing bacterial inhibition of phytochemicals showed that TT1 and TT2 substances resisted to 2 highest virulent strains, such as: NV5M and V7L. The results of this study also indicated that the use of antibiotics in prophylaxis and therapy for fish should be controlled more strictly. The use of phytochemicals replacing antibiotics in aquaculture would be a safe solution. Further studies on molecular (antibiotic resistant gene, plasmid of bacteria) are necessary in order to improve the efficacy of controlling antibiotic use in aquaculture, to reduce environmental pollution so as to protect human health.

Keywords: Climbing perch, virulence, antibiotic resistance, *Vibrio*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá rô đồng, Vietnamese Koi (*Anabas testudineus*) đang được nuôi phổ biến ở một số tỉnh Đông Nam Bộ và ở vùng ĐBSCL, do khả năng thích ứng tốt môi trường nước xấu. Hiện nay, cá rô đồng nuôi thâm canh mang lại hiệu quả kinh tế cao và được nuôi gây giống thử nghiệm trong trang trại nước ngọt ở vùng Mymensingh, Bangladesh (Al Faruk và ctv, 2013). Hiện tại, giải pháp kháng sinh trong phòng và điều trị bệnh được sử dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản Việt Nam (Crumlish và ctv, 2002). Lượng kháng sinh sử dụng ở ao nuôi chỉ là ước tính, dẫn đến liều lượng không chính xác và xuất hiện chủng kháng đa kháng sinh (Van, 2005).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và đánh giá khả năng đa kháng (kháng 2 nhóm kháng sinh trở lên), kháng mở rộng (kháng với toàn bộ kháng sinh thông dụng trong phác đồ) của các chủng *Vibrio* spp. và non-*Vibrio* thu được từ cá rô đồng thương mại và cá giống nghi nhiễm bệnh. Ngoài ra, các chủng thể hiện khả năng đa kháng sẽ được tiếp tục kiểm tra độc lực gây chết bằng mô hình cá giống. Chủng có độc lực cao sẽ được định danh bằng trình tự gen 16SrDNA, và dùng khảo sát hoạt tính kháng *in-vitro* của các loại cao chiết thực vật. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đóng góp thông tin về hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn phân lập từ cá và đề xuất giải pháp hạn chế sử dụng kháng sinh.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm thí nghiệm

Trong nghiên cứu này, việc phân lập, nuôi cấy, thử nghiệm độ nhạy kháng sinh và độc lực của các chủng vi khuẩn được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Thú y, Viện Khoa học Ứng dụng HUTECH, Trường Đại học Công nghệ Tp. HCM.

2.2. Cá thí nghiệm

Mười ba mẫu cá rô đồng thương phẩm và cá giống có dấu hiệu lạ như đen thân, lở đờ, gan có nhiều đốm mủ trắng và xuất huyết được thu mua từ chợ Thủ Đức (~200g/con, 4 con), chợ Lê Văn Sĩ, (~45g/con, 6 con), và trại cá ML (~4g/con, 3 con) ở Tp. HCM. Các mẫu lách, thận, mang và gan của mẫu cá còn sống được thu nhận vô trùng và cấy lên đĩa môi trường Trypton Soy agar (TSA, Himedia, India), và TCBS (TMMedia, India). Đĩa cấy được ủ 24 giờ ở 28°C. Các khuẩn lạc đã làm thuần được bảo quản trong môi trường TSA + 15% glycerol, -80°C. Các vi khuẩn được tăng sinh trên TSA 24 giờ trước khi sử dụng cho thử nghiệm tiếp theo.

2.3. Đánh giá khả năng đa kháng

Thử nghiệm độ nhạy với kháng sinh được thực hiện trên môi trường thạch Muller-Hinton Agar (HiMedia, India) theo phương pháp đĩa khuếch tán kháng sinh của Kirby-Bauer. Theo đó, dung dịch kháng sinh được bổ sung vào giếng (d = 6 mm) đã chuẩn bị sẵn trên đĩa thạch trải đều vi khuẩn (10^8 CFU/ml) để đạt nồng độ cuối cùng tương ứng với từng loại là Amoxicillin (25µg), Ampicillin (10µg), Cefalexin (30µg), Chloramphenicol (30µg), Ciprofloxacin (5µg), Clindamycin (10µg), Doxycycline (30µg), Erythromycin (15µg), Tetracycline (30µg) mua từ công ty Mekophar, Việt Nam. Sau đó, các đĩa thạch được ủ 24 giờ ở 28°C và ghi nhận kháng theo phương pháp được đề xuất bởi CLSI (2006).

2.4. Thử nghiệm độc lực chủng đa kháng

Cá thí nghiệm (~4g/con), màu sắc tươi sáng, phản ứng linh hoạt được nuôi thích nghi 1 tuần trong hệ thống bể 300L, sục khí 24/24 giờ. Trước thử nghiệm, cá được kiểm tra ngẫu nhiên bằng cách quan sát bệnh tích và không nhiễm vi khuẩn trên đĩa TSA. Thí nghiệm cảm nhiễm có 10 con/bể 15L, sục khí 24/24 giờ, theo 2 nghiệm thức: (1) đối chứng, tiêm dung dịch NaCl 0,85% (0.1 ml/cá); (2) cảm nhiễm, tiêm 10^5 CFU/cá các chủng vi khuẩn (bảng 1) vào xoang bụng.

2.5. Khả năng kháng của chiết xuất thực vật

Các chiết xuất thực vật TT1 và TT2 được ly trích tại Phòng thí nghiệm thực vật, Viện Khoa học Ứng dụng HUTECH, Đại học Công nghệ Tp. HCM. Đối với mẫu chiết xuất TT1, bột lá cây thanh trà (*Bouea macrophylla* Griffith) TD1 thu nhận vào tháng 4-5/2019 tại Cần Thơ, được ngâm trong dung môi ethanol 70% kết hợp lắc ở tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10, tốc độ lắc 150 vòng/phút, trong 48 giờ. Dịch chiết được thu nhận sau khi lọc qua giấy lọc để loại bỏ cặn để chuẩn bị quá trình thu cao. Dịch chiết được cô

quay chân không để thu cao. Đối với chiết xuất TT2, lá tía tô sau khi phơi khô được thực hiện ly trích bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước tham khảo theo phương pháp thủy phân (Majolo và ctv, 2016). Cao chiết TT1 và tinh dầu TT2 được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Các đĩa giấy (~6mm) vô trùng được thấm dịch cao chiết pha loãng với DMSO (0,1g/mL đối với cao chiết TT1) hoặc thấm trực tiếp (đối với dịch chiết TT2) được đặt trên bề mặt các đĩa thạch vi khuẩn đã được trải đều (10⁸CFU/ml). Đĩa giấy đối chứng thấm DMSO hoặc nước cất cô trùng.

Bảng 1. Đặc điểm sinh lý sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập từ một số loài cá cảnh

Đặc điểm	Các chủng phân lập từ cá cảnh												
		V2L	V2T	V7G	V7L	V3G	V3T	NV5G	NV5M	Đ1	Đ2T	Đ2V	Đ3
Kháng NaCl	7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8%	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	9%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Hemolysis (5%)		ND	ND	ND	β	B	ND	ND	ND	β	γ	β	ND
Gram		-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-

+, kháng NaCl; -, không kháng NaCl

ND: không thực hiện; β: ly giải hồng cầu kiểu β haemolysis; γ: không ly giải hồng cầu

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn phân lập từ cá rô đồng

Tổng cộng 12/30 chủng vi khuẩn phân lập từ gan, thận, lách, và mang của các mẫu cá nghi nhiễm bệnh (có biểu hiện bên ngoài như cơ thể cá có màu đen bất thường, nhiều trường hợp cá có dấu hiệu lạ, đen thân, và bơi bất thường, bên trong gan có đốm trắng lạ) trên môi trường TSA (20 chủng) và TCBS (10 chủng) được chọn để kiểm tra các đặc điểm về hình thái, sinh lý, sinh hóa do các khuẩn lạc mọc dày và xuất hiện khuẩn thuần sau 24 - 36h, ủ ở nhiệt độ 28°C. Vi khuẩn phân lập đều là các tế bào vi khuẩn Gram âm, dương tính với Catalase và Oxidase, và 11/12 chủng có khả năng phát triển trong môi trường TSB có bổ sung ít nhất

với NaCl 4% (bảng 1). Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây, cụ thể các tác nhân gây bệnh trên cá rô đồng đã được báo cáo có liên quan đến vi khuẩn Gram âm như *Edwardsiella ictaluri* (Nguyễn Duy Khương, 2011), *Aeromonas hydrophila* (Nguyễn Hữu Thịnh và ctv, 2011). Một số loài vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella* và *Vibrio* phân lập từ cá rô đồng nuôi tại nông trại Al-amin ở Mymensingh, Bangladesh được cho là có liên quan mật thiết tới sự bùng phát dịch bệnh cá nghiêm trọng ở Bangladesh và gây ảnh hưởng tới sức khỏe con người (Hossain và ctv, 2017).

3.2. Kết quả thử độ nhạy cảm với kháng sinh

Kết quả kiểm tra độ nhạy của 12 chủng *Vibrio* và non-*Vibrio* với 9 loại kháng sinh đã

cho kết quả kháng hầu hết các loại kháng sinh (bảng 2). Mặc dù các chủng đều nhạy cảm với ciprofloxacin (0/12), loại kháng sinh này đã bị cấm sử dụng trong sản xuất kinh doanh thủy sản (Thông tư số 10/2016/TT-BNNPTNT). Trong khi đó, hầu hết các chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô đồng đều nhạy cảm với kháng sinh erythromycin (10/12 chủng) ngoại trừ chủng V3T và NV5G, và nhạy cảm với amoxicillin (9/12) ngoại trừ chủng Đ1, Đ2T và Đ3, cả hai kháng sinh trên đều thuộc danh mục hạn chế sử dụng. Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, chủng V2L, V2T, V7G, V7L, V3G, NV5G, và NV5M kháng hoàn toàn với kháng sinh amoxicillin (đường kính vòng kháng = 0), tương tự 4 chủng Đ1, Đ2T, Đ2V, và Đ3 phân lập từ cá rô đồng giống (bảng 2) kháng hoàn toàn với kháng sinh erythromycin. Cùng quan điểm

với tác giả của nghiên cứu trước đây (Nguyễn Duy Khương, 2011) cho thấy rằng hai chủng đa kháng *Streptococcus* R17 và R47 phân lập từ 62 mẫu cá rô bệnh đen thân và 4 mẫu cá khỏe tại 9 ao nuôi ở Cần Thơ và Hậu Giang, nếu việc sử dụng kháng sinh không được kiểm soát khoa học sẽ dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh và truyền các gen kháng giữa các loài vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản, sau đó làm tăng cường độc lực của các loài gây bệnh (Aoki, 1988; Cabello và ctv, 2013) và không đạt hiệu quả chữa trị. Ngoài ra, việc tích lũy kháng sinh trong động vật thủy sản có thể gây hại cho môi trường và cho người tiêu thụ. Do đó, thí nghiệm này cho thấy chúng ta cần nâng mức độ cảnh báo hoặc đề xuất cấm sử dụng cả hai loại kháng sinh amoxicillin và erythromycin trong nuôi trồng thủy sản.

Bảng 2. Đặc điểm kháng của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô đồng

Kháng sinh	Nồng độ	Tình trạng [#]	Các chủng phân lập từ cá rô đồng											
			V2L	V2T	V7G	V7L	V3G	V3T	NV5G	NV5M	Đ1	Đ2T	Đ2V	Đ3
Clindamycin	10µg	-	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Ampicillin	10µg	Cấm	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
Amoxicillin	25µg	Hạn chế	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I
Chloramphenicol	30µg	Cấm	R	R	I	R	S	R	S	R	R	S	R	R
Ciprofloxacin	5µg	Cấm	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycin	15µg	Hạn chế	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
Doxycycline*	30µg	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Cefalexin	30µg	-	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Ratio (R/9)			7	6	5	7	6	5	2	7	6	5	8	7

*, following Biorad disc test with strain *E. coli* ATCC 25922; +, kháng; -, không kháng

S = Susceptible, I = Intermediate, R = Resistant;

[#] Thông tư số 10/2016/TT-BNNPTNT ngày 01/6/2016 của Bộ Nông nghiệp và PTNT

3.3. Kết quả thí nghiệm độc lực gây chết cá

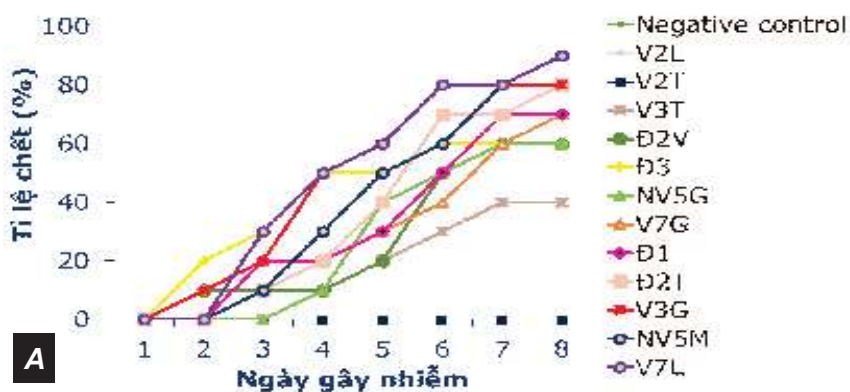
Kết quả cảm nhiễm nhân tạo 12 chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô đồng cho thấy 10/12 chủng có thể gây chết cá với tỷ lệ chết từ 40-90%. Cụ thể, tỷ lệ cá chết 50% được ghi nhận ở

nhóm cá gây nhiễm với chủng Đ3, 60% ở nhóm tiêm V3G và V7L sau 5 ngày (hình 1A). Tỷ lệ cá chết cao nhất được ghi nhận ở các nhóm gây nhiễm với chủng Đ2T (80%); V3G (80%); NV5M (90%); và V7L (90%) ở mật độ 10⁶ CFU/ml sau 8 ngày. Trong khi đó, nhóm đối chứng và

V2L, V2T cá vẫn hoạt động bình thường trong suốt thời gian thí nghiệm. Vi khuẩn tái phân lập từ các mẫu cá chết đều có tính đồng nhất và bước đầu được xác định với hình thái giống như các vi khuẩn gây cảm nhiễm ban đầu (hình 1B, C).

Đối với chủng có độc lực cao NV5M, kết quả định danh bằng trình tự 16SrDNA cho thấy chúng có có mức độ tương đồng cao nhất với *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* (T);

MDC47 (99,84%). Tương tự như kết quả trong nghiên cứu này, các chủng *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* phân lập từ nhiều nguồn khác nhau bao gồm từ nước, lươn (wild European eels) và phân người đều là chủng đa kháng (kháng với ticarcillin, axit amoxicillin-clavuronic, cefoxitin và imipenem) (Esteve và ctv, 2012). Nghiên cứu này chỉ ra rằng *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* có thể là một tác nhân gây bệnh cho người (Chen và ctv, 2016) nếu sử dụng các thực phẩm từ cá có nhiễm loại khuẩn này.



Hình 1. Đặc điểm độc lực của các phân lập vi khuẩn trên mô hình cá rô đồng giống
(A) Kết quả khảo sát độc lực của 12 chủng vi khuẩn phân lập trên mô hình cá rô đồng ($n=10$ con/thí nghiệm); (B) Các triệu chứng biểu hiện bệnh ở cá gây nhiễm với chủng NV5M bao gồm bên ngoài xuất huyết, mắt vàng và đuôi bị ăn mòn; (C) bên trong xoang bụng chứa dịch máu.

3.4. Hoạt tính kháng khuẩn của các dược chất thực vật

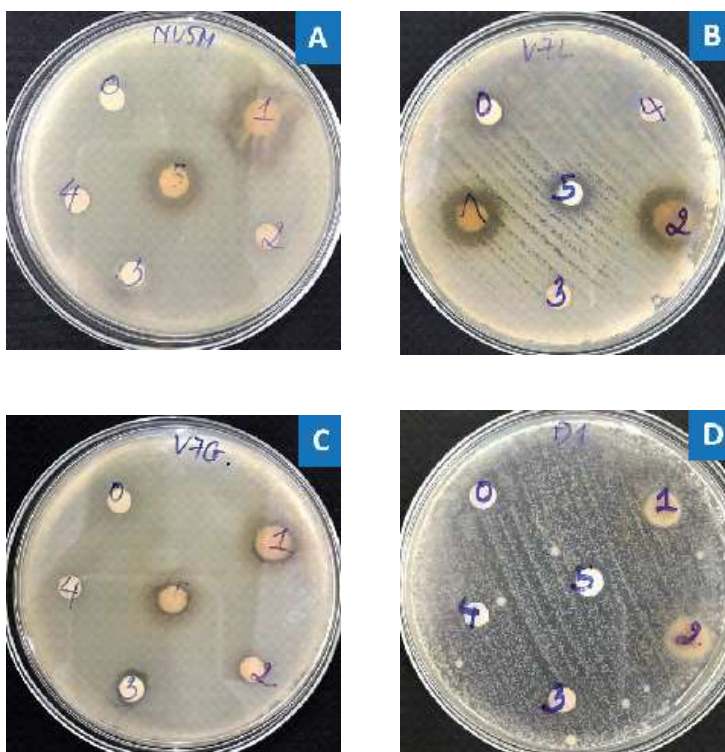
Các kết quả trình bày trên cho thấy, chiết xuất thực vật TT1 và TT2 đều có khả năng ức chế sự phát triển của chủng NV5M và V7L (hai chủng có độc lực cao nhất), chủng D1 và V7G (hình 2). Khả năng ức chế vi khuẩn của các loại ly trích thực vật lên các chủng có độc

lực gây chết cao ở cá rô đồng tạo tiền đề cho các mô hình nghiên cứu điều trị bệnh học thủy sản, đồng thời cung cấp cơ sở khoa học cho việc ứng dụng chiết xuất từ loài cây này trong bảo chế dược phẩm, điều trị các trường hợp ngộ độc thực phẩm do ăn phải cá nhiễm khuẩn.

Bước đầu phân tích các thành phần hóa học của cao chiết TT1 cho thấy thành phần cao

chiết TD1 có sự hiện diện của một số hợp chất thứ cấp như polyphenol, hợp chất glycoside, flavonoid, và triterpenoid (dữ liệu không mô tả trong nghiên cứu này). Chiếm tỷ lệ cao trong các hợp chất trên (Sukalingam, 2018), các dẫn xuất phenol có khả năng tham gia kiểm soát sự

phát triển của vi khuẩn bằng cách thay đổi tính thấm của màng hoặc làm giảm độ pH, trong khi đó tác dụng kháng khuẩn Flavonoid có thể tiêu diệt hoặc ức chế tế bào vi khuẩn theo nhiều cách khác nhau (Górniak và ctv, 2019).



Hình 2. Đặc điểm kháng vi khuẩn phân lập từ cá rô đồng của các chiết xuất thực vật
Hoạt tính của chiết xuất thực vật TT1 kháng chủng NV5M (đĩa giấy 1, hình A), V7L (đĩa giấy 1, hình B), V7G (đĩa giấy 1, hình C), và Đ1 (đĩa giấy 1, hình D); TT2 kháng chủng NV5M (đĩa giấy 2, hình A), V7L (đĩa giấy 5, hình B), V7G (đĩa giấy 3, hình C), và Đ1 (đĩa giấy 3, hình D), đối chứng (đĩa giấy 0).

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng 30 chủng phân lập từ cá rô đồng bao gồm chủng *Vibrio* (10/30 chủng) hoặc non-*Vibrio* (20 chủng). 11/12 chủng có khả năng kháng ít nhất với NaCl 4%, và kháng ít nhất 5 loại kháng sinh (trong tổng số 9 loại kháng sinh thử nghiệm). Những chủng vi khuẩn này có khả năng gây chết cá trong thí nghiệm cảm nhiễm với cá rô đồng giống. Do đó, khi các chủng vi khuẩn đa kháng này gây bệnh sẽ có thể đặc biệt khó kiểm soát.

Dịch chiết thực vật TT1 và TT2 có hiệu quả kháng vi khuẩn có độc lực gây chết cao (chủng NV5M và V7L) trong nghiên cứu này. Do đó, các hướng nghiên cứu tiếp theo cần khảo sát hiệu quả bảo vệ cá của các loại dịch chiết thực vật trên mô hình cá cũng như quy mô trang trại để tiến tới việc thay thế kháng sinh dự phòng và chữa bệnh trong nuôi trồng thủy sản bằng giải pháp an toàn. Ngoài ra, các cơ chế làm xuất hiện hiện tượng siêu kháng, ức chế của dịch chiết thảo dược, cũng như các đặc điểm phân tử của các gen kháng thuốc, cũng cần được phân tích.

Lời cảm ơn: Quỹ nghiên cứu Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Công nghệ, TP. HCM đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aoki, T., 1988. Drug resistance plasmids from fish pathogens. *Microbiol. Sci.* 5: 219-223.
2. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496.
3. Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., Buschmann, A.H., 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 15:1917-1942.
4. Chen, P.L., Lamy, B., & Ko, W.C., 2016. *Aeromonas dhakensis*, an Increasingly Recognized Human Pathogen. *Frontiers in microbiology* 7, 793. doi:10.3389/fmicb.2016.00793
5. CLSI., 2006. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Approved guideline VET03-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
6. Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngoc, N.T.N., and Ferguson, H.W., 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Fish Dis.* 25: 733- 736.
7. Esteve, C., Alcaide, E., Blasco, M.D., 2012. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. *Microbes Environ.* [Epub ahead of print.doi.org/10.1264/jsme2.ME12009.
8. Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J., 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev* 18:241-272.
9. Majolo, C., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Bizzo, H.R., Rocha, S.I.B., Oliveira, S.R.N., Oliveira, M.A.S., 2016. Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais. Embrapa Documentos nº 126.
10. Nguyễn Duy Khương, 2011. Xác định tác nhân gây bệnh đen thân trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*). Luận văn tốt nghiệp đại học. Đại học Cần Thơ.
11. Nguyễn Hữu Thịnh, Bùi Thị Kim Cương, Đỗ Việt Phương, 2011. Một trường hợp nhiễm nặng *Trypanosoma* sp trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) nuôi thâm canh. Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM.
12. Sukalingam, K., 2018. Preliminary phytochemical analysis and in vitro antioxidant properties of Malaysian 'Kundang' (*Bouea macrophylla* Griffith). *Trends in Phytochemical Research* 2(4) 2018 261-266.
13. Van, P.T., 2005. Current status of aquaculture veterinary drugs usage for aquaculture in Vietnam. In Proceedings of the international workshop on antibiotic resistance in Asian aquaculture environments. Chiang Mai, Thailand. ISBN 88-901344-3-7.

Ngày nhận 16-9-2019

Ngày phản biện 29-9-2019

Ngày đăng 1-1-2020