

**PHÂN LẬP VI KHUẨN TỪ SAN HỒ MỀM *Sinularia* spp. VÀ THỬ NGHIỆM
HOẠT TÍNH KHÁNG TETRACYCLINE, GENTAMICIN
VÀ CEFAZOLIN CỦA CHÚNG**

Phạm Thị Miên, Võ Hải Thi, Lê Hoài Hương, Hoàng Xuân Bền
Viện Hải dương học

Tóm tắt San hô mềm là một trong những đối tượng chứa nhiều hợp chất hoạt tính sinh học, tuy nhiên mối liên quan giữa san hô mềm, vi khuẩn sống cùng nó và các chất hoạt tính sinh học vẫn đang còn được thảo luận. Bốn trong số năm mẫu san hô mềm sử dụng trong nghiên cứu này được xác định là *Sinularia gibberosa* Tixier-Durivault, 1970 (ký hiệu SH1); *Sinularia maxima* Verseveldt, 1971 (ký hiệu SH2); *Sinularia capillosa* Tixier-Durivault, 1970 (ký hiệu SH3); và *Sinularia mira* Tixier-Durivault, 1970 (ký hiệu SH4). Bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống, đã phân lập được 28 chủng vi khuẩn từ các mẫu san hô mềm bao gồm 26 chủng của ngành Firmicutes và hai chủng của ngành Proteobacteria. Trong tổng số 25 chủng kiểm tra hoạt tính kháng các kháng sinh Tetracycline (TET), Gentamicin (GEN) và Cefazolin (CZ), chỉ có một chủng KH4 có hoạt tính kháng CZ. Chủng này sau đó được xác định là *Bacillus cereus* 1 bằng phép thử API 50CHB với độ chính xác 99,7%. Các chủng còn lại thể hiện sự nhạy cảm với CZ (với vòng kháng khuẩn từ 6 đến 17mm). Tuy nhiên, KH6 và KH10 ít nhạy cảm với GEN và CZ, trong khi KH18 lại ít nhạy cảm nhất đối với TET.

**ISOLATION OF BACTERIA FROM SOFT CORAL *Sinularia* spp. AND TEST OF
THEIR ANTIBIOTIC RESISTANCE ON TETRACYCLINE,
GENTAMICIN AND CEFAZOLIN**

Pham Thi Mien, Vo Hai Thi, Le Hoai Huong, Hoang Xuan Ben
Institute of Oceanography

Abstract Soft coral is marine organism considered as a source of bioactive compounds. However, the relationship between soft coral, its associated microorganisms and its bioactive compounds are still discussed. Four among five collected specimens of soft coral were identified as *Sinularia gibberosa* Tixier-Durivault, 1970 (code: SH1); *Sinularia maxima* Verseveldt, 1971 (code: SH2); *Sinularia capillosa* Tixier-Durivault, 1970 (code: SH3); and *Sinularia mira* Tixier-Durivault, 1970 (code: SH4). 28 bacteria strains were isolated from specimens of soft corals by traditional culture method, including 26 strains of Firmicutes phylum and two others of Proteobacteria phylum. Among 25 strains tested for antibiotic activity, only the KH4 exhibited resistance to Cefazoline, then this strain was identified as *Bacillus cereus* 1 by using the API 50CHB KIT with accuracy of 99.7%. The other strains showed the sensitivity to Cefazolin with inhibitable zone ranging from 6 to 17mm. Strains of KH6 and KH10 showed the weak sensitivity with Gentamicine and Cefazolin, while KH18 showed the weak sensitivity to Tetracycline.

I. MỞ ĐẦU

Vi sinh vật biển là đối tượng đang được quan tâm nghiên cứu tìm kiếm các chất có hoạt tính sinh học cho ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như dược phẩm, nông nghiệp, thủy sản. Hiện nay các nhà khoa học quan tâm nhiều đến vi sinh vật sống cùng (associated with) các sinh vật biển như bọt biển (Anand và cs., 2006), động vật thân mềm (Romanenko và cs., 2006), và san hô (Webster và Bourne, 2007) cho mục tiêu nghiên cứu đa dạng vi sinh vật biển và tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học. Lamper và cs. (2006) đã kết hợp phương pháp nghiên cứu vi sinh vật truyền thống và đặc tính kháng kháng sinh để nghiên cứu đa dạng vi khuẩn sống cùng san hô *Fungia scutaria*. Phải chăng, khả năng sản sinh các chất kháng sinh và kháng lại chất kháng sinh của vi sinh vật đã được Lamper sử dụng để nghiên cứu từng chủng vi khuẩn cho mục đích tìm kiếm được liệu đặng sau sự nghiên cứu đa dạng vi sinh vật? Theo định hướng nghiên cứu đa dạng vi sinh vật biển sống cùng san hô mềm và các hợp chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc vi sinh vật biển, bài báo này trình bày kết quả phân lập một số vi sinh vật biển sống cùng giống san hô mềm *Sinularia* và thử nghiệm hoạt tính kháng các kháng sinh có các nhóm gốc khác nhau bao gồm Tetracycline, Gentamicin và Cefazolin.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Thu mẫu và phân loại san hô mềm:

1.1. Thu mẫu:

Các mẫu san hô mềm được thu ở vùng biển thuộc Đông Bắc Hòn Tằm, vịnh Nha Trang (109°14'43'' - 12°10'47''), ở độ sâu 4 - 9m nước, nhiệt độ nước biển 28°C và độ mặn 31‰. Tùy theo kích thước của mỗi tập đoàn san hô mềm, mẫu có thể được thu toàn bộ hoặc cắt một phần tập đoàn để đáp ứng yêu cầu phân loại san hô mềm và phân lập vi sinh vật (30 - 40g).

1.2. Bảo quản và xử lý mẫu:

Mẫu san hô mềm sau khi thu được ngâm trong dung dịch Formalin 10% trong 24 giờ, sau đó rửa sạch và bảo quản trong ethanol 70%.

1.3. Tách mẫu:

Cắt từng phần khác nhau của tập đoàn san hô (polyp, phần nhánh tập đoàn, bên trong nhánh, phần vỏ thân tập đoàn, bên trong vỏ thân) ngâm riêng biệt vào dung dịch Chlorine 10% trong vòng 30 phút để tẩy phần thịt, sau đó lọc lấy các trâm xương.

1.4. Phân loại:

Xác định các dạng trâm xương khác nhau trên kính hiển vi có độ phóng đại 10 x 4 và 10 x 10. Một số đặc điểm khác của tập đoàn như kích thước, khoảng cách polyp, số lượng các Siphonozoid... được xác định trên kính lúp. Xác định thành phần loài dựa theo các tài liệu phân loại của các tác giả Verseveldt (1980), Ofwegen (2000, 2008) và Tixer-Durivault (1970).

2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật:

a. *Môi trường MPA-hay còn gọi là môi trường thạch thường*: Cao thịt: 3g/l; peptone: 5g/l; agar: 13g/l; NaCl: 5g/l; pH= 7,5 ± 0,2. Đây là môi trường thông thường để nuôi cấy vi khuẩn dị dưỡng có bổ sung NaCl để nuôi cấy vi khuẩn biển.

b. *Môi trường khoáng - SWM (Romanenko và cs., 2006)*: Peptone: 5g/l; cao nấm men: 2,5g/l; glucose: 1g/l; K₂HPO₄: 0,1g/l; MgSO₄.7H₂O: 0,1g/l; agar: 15g/l; nước biển lọc: 500ml và nước cất 500ml; điều chỉnh pH = 7,5 ± 0,2.

c. *Nutrient Agar (NA)*: Môi trường thương mại (Himedia, Ấn Độ) chuyên dùng để nuôi cấy vi khuẩn dị dưỡng ưa muối (bổ sung 5g/l NaCl).

d. *Môi trường MHA (Mueller Hinton Agar)*: Môi trường thương mại (Himedia, Ấn Độ) dùng để kiểm tra hoạt tính kháng kháng sinh (Bauer và Kirby, 1966).

3. Phân lập vi khuẩn từ san hô mềm *Sinularia* spp.:

Các mẫu san hô mềm được rửa với ethanol 70%, rửa lại với nước biển lọc vô trùng, cắt mỗi loài san hô mềm 2x2cm, sau đó nghiền vô trùng và dùng làm 2 ống mẫu gốc, pha loãng dần theo tỉ lệ 10 lần đến 10⁴ lần bằng nước biển lọc vô trùng.

Dùng dung dịch chiết từ mẫu san hô trên dãy nồng độ 0 - 10⁴ nuôi cấy trên môi trường SWM, tách những khuẩn lạc riêng rẽ, có hình dạng và màu sắc bên ngoài khác nhau để tiếp tục cấy truyền sang môi trường mới cho đến khi thu được khuẩn lạc thuần (Sharon và Rosenberg, 2008).

Nuôi những vi khuẩn thuần trên môi trường NA và quan sát khuẩn lạc sau 3 ngày nuôi cấy, quan sát ghi nhận màu sắc và hình dạng khuẩn lạc.

Nuôi cấy những vi khuẩn đã được quan sát hình dạng khuẩn lạc sang môi trường mới ở 30°C và trong vòng 24 giờ, sau đó nhuộm gram, quan sát hình dạng tế bào dưới kính hiển vi thường (Olympus CH30), kiểm tra sự có mặt của bào tử và đối chiếu kết quả theo bảng phân loại hình thái của Bergey (1984). Dùng KIT API 50 CHB (Mỹ) phân loại vi khuẩn hình que, gram dương và có bào tử.

4. Thử nghiệm khả năng kháng kháng sinh:

Vì các vi khuẩn sinh trưởng ở 28, 30 hay 37°C đều nằm trong giới hạn nhiệt độ

của vi khuẩn ưa ấm (20-40°C), nên ở những bước nuôi cấy để kiểm tra đặc điểm hình thái và khuẩn lạc cũng như đặc điểm tế bào, các chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường NA hoặc SWM ở nhiệt độ phòng (khoảng 30°C). Sau 24 giờ nuôi cấy, chọn những khuẩn lạc thuần cấy vào môi trường canh thang. Nuôi tăng sinh ở nhiệt độ phòng cho đến khi mật độ vi khuẩn đạt đến nồng độ chuẩn McFarland (10⁴cfu/ml). Dùng 100µl dung dịch vi khuẩn đã đạt tiêu chuẩn McFarland cấy trang lên đĩa petri có sẵn môi trường MHA, sau đó đặt các miếng giấy tròn nhỏ có sẵn chất kháng sinh (sản phẩm của Bio-Rad) vào trung tâm đĩa petri, nuôi ở nhiệt độ 37°C và đo vòng kháng khuẩn sau 24 giờ (Bauer và Kirby, 1966). Độ nhạy cảm kháng sinh được tính bằng bán kính vòng kháng khuẩn (mm), các chủng vi khuẩn vẫn mọc (không xuất hiện vòng kháng khuẩn) trên môi trường có kháng sinh được coi là kháng lại kháng sinh đó.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân loại san hô mềm:

Trong số năm mẫu san hô mềm thuộc giống *Sinularia*, bốn mẫu đã được phân loại đến loài bao gồm *Sinularia gibberosa* Tixier-Durivault, 1970; *Sinularia maxima* Verseveldt, 1971; *Sinularira capillosa* Tixier - Durivault, 1970 và *Sinularia mira* Tixier - Durivault, 1970 (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân loại các mẫu san hô mềm dùng trong nghiên cứu
Table 1. The results on classification of specimens of soft coral

Kí hiệu mẫu	Loài
SH 1	<i>Sinularia gibberosa</i> Tixier-Durivault, 1970
SH 2	<i>Sinularia maxima</i> Verseveldt, 1971
SH 3	<i>Sinularira capillosa</i> Tixier-Durivault, 1970
SH 4	<i>Sinularia mira</i> Tixier-Durivault, 1970
SH 5	<i>Sinularia</i> sp.

2. Vi khuẩn phân lập từ các *Sinularia* spp.:

Đã phân lập được 28 chủng vi sinh vật (ký hiệu từ KH1 đến KH28 - Bảng 2)

từ năm loài san hô mềm (*Sinularia gibberosa*, *S. maxima*, *S. capillosa*, *S. mira* và *Sinularia* sp.) khi nuôi cấy trên môi trường SWM ở nhiệt độ 28, 30 và 37°C. Cùng môi trường nuôi cấy SWM, ở nhiệt

độ 28°C (tương đương với nhiệt độ nước biển tại thời điểm thu mẫu), phân lập được 15 chủng vi khuẩn, trong khi ở 30°C chỉ phân lập được bảy chủng và ở 37°C được sáu chủng. Tuy nhiên, khi nuôi ở 28°C, vi khuẩn sinh trưởng tương đối chậm, có những chủng như KH14, KH15 chỉ có thể phân lập được sau 15 ngày nuôi cấy. Các chủng nuôi ở 30 và 37°C sinh trưởng nhanh hơn, có thể phân lập được sau 3-7 ngày nuôi cấy. Như vậy, mặc dù sử dụng năm loài san hô mềm *Simularia*, nhưng trong nghiên cứu này chỉ phân lập được số

lượng vi khuẩn tương đối hạn chế (28 chủng). Đây có thể do phương pháp nuôi cấy truyền thống chỉ thích hợp đối với những chủng vi khuẩn dễ tính về mặt dinh dưỡng (những chủng vi khuẩn có thể mọc được trên môi trường thạch thường). Theo nghiên cứu vi khuẩn sống trong dịch nhầy san hô *Fungia scutaria* của Lampert và cộng sự (2006), vi khuẩn phân lập được theo phương pháp nuôi cấy thông thường trên thạch chỉ đạt gần 1% tổng số vi khuẩn sống trong dịch nhầy.

Bảng 2. Các chủng vi khuẩn phân lập từ năm mẫu san hô mềm
Table 2. The bacterial strains isolated from 5 specimens of soft coral

Mẫu san hô	Ký hiệu	Nhiệt độ nuôi cấy		
		28 °C	30 °C	37 °C
<i>Simularia gibberosa</i>	SH 1.1	0	0	0
	SH 1.2	2 (KH 19, 20)	1 (KH 2)	3 (KH 3, 4, 5)
<i>Simularia maxima</i>	SH 2.1	1 (KH 16)	0	0
	SH 2.2	0	0	0
<i>Simularia capillosa</i>	SH 3.1	1 (KH 28)	1 (KH 1)	0
	SH 3.2	0	0	0
<i>Simularia mira</i>	SH 4.1	1 (KH 15)	0	0
	SH 4.1	5 (KH 17, 18, 23, 24, 27)	0	0
<i>Simularia</i> sp.	SH 5.1	2 (KH 21, 22)	2 (KH 6, 13)	1 (KH 11)
	SH 5.2	3 (KH 14, 25, 26)	3 (KH 9, 10, 12)	2 (KH 7, HK 8)
Tổng số		15	7	6

Ghi chú: Lấy 2 mẫu lặp (duplicate) từ mỗi loài san hô mềm để phân lập vi khuẩn (xem phần phương pháp) do đó mỗi mẫu san hô mềm sẽ có hai mẫu song song, ví dụ san hô mềm *Simularia gibberosa* kí hiệu SH1 sẽ có hai mẫu SH 1.1 và SH 1.2, mẫu SH 1.1 không phân lập được vi khuẩn nào ở cả ba nhiệt độ nuôi cấy, mẫu SH 1.2 phân lập được 2 vi khuẩn kí hiệu là KH19, và KH20, tương tự như vậy đối với các mẫu san hô còn lại.

2.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn:

Bảng 3 thống kê các kết quả ghi nhận về kích thước, hình dạng và màu sắc khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn thuần được nuôi cấy trên môi trường SWM và môi trường NA. Theo kết quả này, nhiều khuẩn lạc vi khuẩn giống nhau về kích thước hình dạng và màu sắc. Theo Bergey (1984), đặc điểm khuẩn lạc không đủ thông tin cho phân loại kể cả ở mức độ ngành (phylum) nên chúng được phân tích về đặc điểm tế bào. Chủng KH13 có hình dạng khuẩn lạc của một xạ khuẩn với màu sắc trắng xốp bề

mặt khô nhẵn có hình tia (kí hiệu là XK), tuy nhiên đề tài này chỉ đề cập đến vi khuẩn sống cùng san hô mềm nên KH13 không được nghiên cứu sâu hơn.

2.2. Đặc điểm hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn:

Bảng 4 trình bày kết quả quan sát các tế bào nhuộm gram dưới kính hiển vi của các chủng vi khuẩn được cấy truyền sang đĩa môi trường NA mới. Trong số 28 chủng phân lập ban đầu, có một chủng xạ khuẩn KH13 và hai chủng KH1 và KH15 không phát triển sau khi cấy truyền, do đó, ba chủng này không được nghiên cứu tiếp

theo (kí hiệu trong bảng 4 là KPT). Trong số 26 chủng vi khuẩn nhuộm gram, có hai vi khuẩn gram âm (KH14 và KH25) thuộc ngành Proteobacteria, 24 vi khuẩn gram dương và một xạ khuẩn (gram dương). Như vậy, vi khuẩn ngành Firmicutes chiếm hơn 92,3% tổng số các chủng phân lập. Kết quả nghiên cứu này có sự khác biệt với nghiên cứu của Lampert và cs. (2006), khi nhóm tác giả này xác định nhóm vi khuẩn phân lập từ san hô nấm *Fungia scutaria* chủ yếu là các vi khuẩn gram âm ngành Proteobacteria (Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria), sau đó mới đến gram dương ngành Firmicutes (Actinobacteria). Sự khác biệt này có thể do phương pháp sử

dụng khác nhau, ví dụ: Rohwer và cộng sự (2001) chỉ ra rằng khi nghiên cứu bằng phương pháp sinh học phân tử không phụ thuộc nuôi cấy, các đoạn 16S ARN chỉ ra rằng Alphaproteobacteria là chiếm ưu thế, ngược lại vi khuẩn nhóm Gammaproteobacteria lại được tìm thấy nhiều nhất bằng phương pháp nuôi cấy thông thường. Mặt khác, những loài san hô khác nhau thì có hệ vi khuẩn cũng khác nhau mặc dù cùng vùng địa lý, trong khi hệ vi khuẩn sống cùng một loài san hô mềm thì giống nhau kể cả được nghiên cứu ở thời gian và không gian khác nhau (Rohwer và cs., 2002).

Bảng 3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn
Table 3. Morphology of colony of bacterial strains

STT	Kí hiệu chủng	Đường kính (cm)	Màu sắc	Hình dạng
1	KH1	0,2-0,3	Trắng	F
2	KH2	0,3-0,4	Kem (SWM) Trắng (NA)	Tròn dẹt, mép đều bề mặt bóng trên SWM và khô, hai vòng tròn đồng tâm (VTĐT) trên NA
3	KH3	0,3-0,4	Kem (SWM) Trắng (NA)	Tròn dẹt, mép đều bề mặt bóng trên SWM và khô, hai VTĐT trên NA
4	KH4	1,2-1,5	Kem Trắng	Tròn, hơi lồi ở trung tâm, dẹt mép gọn bề mặt khô nhìn như giọt nến
5	KH5	0,3-0,5	Trắng	Tròn, mép đều bề mặt bóng ướt
6	KH6	0,3-0,4	Kem	Tròn, mép gọn, bề mặt khô ráp, hai VTĐT
7	KH7	0,5-0,6	Trắng/Kem	Tròn, lồi bề mặt nhẵn khô như giọt nến
8	KH8	0,3-0,4	Trắng đục	Tròn dẹt, mép đều bề mặt bóng trên SWM và khô, hai VTĐT trên NA
9	KH9	0,2-0,4	Trắng đục	Tròn, dẹt, mép đều bề mặt bóng ướt
10	KH10	0,1-0,2	Trắng sữa	Tròn, mép đều bề mặt láng ướt
11	KH11	0,2-0,3	Trắng đục	Tròn, mép gọn, hai VTĐT ngoài khô nhẵn trong láng bóng ướt
12	KH12	0,3-0,4	Trắng đục	Tròn dẹt, mép đều bề mặt bóng trên SWM và khô, hai VTĐT trên NA
13	KH13	0,1	Xạ khuẩn	Trắng xốp, tròn có hình tia
14	KH14	0,2-0,3	Cam	Tròn, lồi, bề mặt ướt bóng như có nước
15	KH15	0,1	Đỏ	Tròn, dính chặt vào mặt thạch
16	KH16	1-1,2	Kem/Trắng	Tròn, dẹt, mép răng cưa
17	KH17	0,3-0,4	Vàng	Tròn, hơi lồi, bề mặt khô nhẵn
18	KH18	0,2-0,3	Trắng sữa	Tròn, dẹt, bề mặt bóng ướt mép gọn
19	KH19	0,2-0,4	Trắng sữa	Tròn dẹt, mép đều bề mặt bóng trên SWM và khô, hai VTĐT trên NA
20	KH20	0,2-0,3	Kem	Tròn, dẹt, mép gọn, bề mặt bóng ướt
21	KH21	0,2-0,3	Kem	Tròn, dẹt, mép gọn, bề mặt bóng ướt
22	KH22	0,3-0,4	Trắng sữa/Kem	Tròn, mép gọn, khía kim đồng hồ bóng ướt trên mặt khô mịn

23	KH23	0,1-0,2	Kem	Tròn, mép gọn, bề mặt khô lốm bóng
24	KH24	0,3-0,4	Trắng	Tròn, mép đều, bề mặt láng ướt
25	KH25	0,4-0,5	Trắng ánh xanh	Tròn, mép gọn, bề mặt bóng ánh xanh
26	KH26	0,3-0,4	Trắng sữa/Kem	Tròn, mép gọn, khía kim đồng hồ bóng ướt trên mặt khô mịn
27	KH27	0,4-0,6	Trắng/Kem	Tròn, lồi, bề mặt nhẵn khô như giọt nến
28	KH28	0,2-0,3	Trắng đục	Tròn, mép gọn, hai VTĐT ngoài khô nhẵn, trong láng bóng ướt

Ghi chú: Đo đường kính khuẩn lạc: Đo những khuẩn lạc đứng tách rời và có khoảng cách lớn nhất với khuẩn lạc đứng gần nó nhất. F: Nhiễm trong quá trình thao tác nuôi cấy.

Bảng 4. Đặc điểm hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn
Table 4. Characteristics of cell morphology of bacterial strains

STT	Kí hiệu chủng	Gram	Kích thước (µm)	Hình dạng
1	KH 1	+		KPT
2	KH2	+	0,35 x 0,07	Hình que ngắn, khi sinh trưởng có hình elip, đơn hoặc đôi, có bào tử
3	KH3	+	0,35 x 0,07	Hình que ngắn, khi sinh trưởng có hình elip, đơn hoặc đôi, có bào tử
4	KH4	+	0,3 x 0,01	Hình que, có bào tử
5	KH5	+	0,3 x 0,01	Hình que, elip, có bào tử
6	KH6	+	0,4 x 0,01	Hình que ngắn, đơn elip, có bào tử
7	KH7	+	0,7 x 0,02	Hình que lớn, có bào tử
8	KH8	+	0,4 x 0,01	Que ngắn, đơn, có bào tử
9	KH9	+	0,2 x 0,01	Hình que, elip có bào tử
10	KH10	+		Hình ovan, có bào tử
11	KH11	+	0,25 x 0,02	Hình ovan, có bào tử
12	KH12	+		Hình ovan, có bào tử
13	KH13	XK		KPT
14	KH14	-	0,5 x 0,01	Hình que, phẩy khuẩn không có bào tử
15	KH15	KPT		KPT
16	KH16	+	0,3 x 0,01	Hình que ngắn, có bào tử
17	KH17	+	0,2	Hình cầu, không có bào tử
18	KH18	+	0,2	Đơn cầu khuẩn, có bào tử
19	KH19	+	0,4 x 0,01	Hình que ngắn, đơn, có bào tử
20	KH20	+	0,03 x 0,01	Hình que ngắn, có bào tử
21	KH21	+	0,03 x 0,01	Hình que ngắn, có bào tử
22	KH22	+	0,25 x 0,02	Hình ovan, có bào tử
23	KH23	+		Hình ovan, có bào tử
24	KH24	+		Hình ovan, không có bào tử
25	KH25	-	0,5 x 0,01	Hình que, không có bào tử
26	KH26	+	0,25 x 0,02	Hình ovan, có bào tử
27	KH27	+	0,7 x 0,02	Hình que lớn, có bào tử
28	KH28	+	0,25 x 0,02	Hình ovan, có bào tử

Trong số 25 chủng vi khuẩn nghiên cứu tiếp theo (trừ KH1 bị nhiễm trong quá trình cấy truyền giống), 13 chủng vi khuẩn (KH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 19, 20, 21, và 27) có tế bào hình que, gram dương, có bào tử, hiếu khí. Theo phân loại hình thái của Bergey, những chủng này được xác định thuộc chi *Bacillus*. Hai chủng gram âm, hình que, không sinh bào tử là KH14 và KH25. KH25 có màu trắng ánh xanh trên môi trường NA, gram âm, tế bào hình que không có bào tử, di động – được xác định thuộc chi *Pseudomonas*. Kết quả của nghiên cứu này cho rằng các chi *Bacillus* chiếm ưu thế khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của Beleneva và cộng sự (2005) tại vịnh Nha Trang đã ghi nhận vi khuẩn gram âm thuộc nhóm Gammaproteobacteria chiếm thành phần chủ yếu, trong đó chi *Pseudomonas* chiếm ưu thế nhất trong số các vi khuẩn phân lập từ 11 loài san hô khỏe mạnh và san hô bệnh. Thêm vào đó, cũng phân lập được vi khuẩn gram dương chủ yếu thuộc các chi *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Halococcus* và *Micrococcus* spp.

Khuẩn lạc KH17 có bề mặt khô, hơi lồi, màu vàng trên môi trường nutrient agar, hiếu khí, soi dưới kính hiển vi tế bào nhỏ, hình cầu, gram dương, không sinh bào tử, kiểm tra catalase dương tính. Theo phân loại Bergey, KH17 có những đặc điểm cơ bản của chi *Micrococcus*, với đặc điểm tạo khuẩn lạc vàng sáng trên NA, do đó KH17 được xác định là *Micrococcus luteus*. Kết quả này tương tự một số kết quả nghiên cứu khác. Vacelet và Thomassin (1991) chỉ ra rằng vi khuẩn gram dương *Micrococcus* sp. là loài thường gặp nhất sống cùng các san hô *Sarcophyton*, *Fungia* và *Acropora* ngoài những vi khuẩn gram âm. Khi nghiên cứu đa dạng vi sinh vật sống cùng dịch nhầy san hô *Fungia scutaria* tại biển Đỏ, Lampert và cộng sự (2006) cũng tìm thấy sự có mặt của *Micrococcus luteus*.

Như vậy nghiên cứu này đã xác định được 26 chủng vi sinh vật thuộc ngành Firmicutes và hai chủng thuộc ngành Proteobacteria. Trong số 26 Firmicutes, có chín chủng vi khuẩn thuộc lớp Bacilli, bộ

Bacillales, họ Bacillaceae, chi *Bacillus* và một vi khuẩn thuộc lớp Actinobacteria, bộ Actinomycetales, họ Micrococcaceae, chi *Micrococcus*, loài *Micrococcus luteus*. Những chủng còn lại thuộc ngành Firmicutes chưa xác định được đến mức độ lớp. Trong số hai vi khuẩn gram âm, KH25 được xác định thuộc ngành Proteobacteria, lớp Gamma Proteobacteria, bộ Pseudomonadales, họ Pseudomonadaceae, chi *Pseudomonas*.

3. Hoạt tính kháng TET, GEN và CZ của các chủng vi khuẩn:

Trong số 25 chủng được kiểm tra hoạt tính kháng lại kháng sinh Tetracycline (TET), Gentamicin (GEN) và Cefazolin (CZ) (Bảng 5), chỉ có chủng KH4 kháng lại CZ (không xuất hiện vòng kháng khuẩn) và nhạy cảm với cả hai kháng sinh TET và GEN lần lượt với các vòng kháng khuẩn là 5,5 và 6mm. KH18 thể hiện ít nhạy cảm đối với TET nhất (vòng kháng khuẩn nhỏ nhất là 2,5mm) trong số 25 chủng kiểm tra, trong khi KH17 lại nhạy cảm nhất đối với TET (vòng kháng khuẩn là 11,5mm). Các chủng còn lại có vòng kháng khuẩn đối với TET nằm ở khoảng từ 6 đến 11mm. Chủng KH6 và KH10 thể hiện độ nhạy cảm đối với GEN thấp nhất với vòng kháng khuẩn lần lượt là 1 và 2mm, các chủng còn lại thể hiện độ nhạy cảm đối với GEN tương đối đồng đều từ 6 đến 8mm. Đối với CZ, đa số các chủng kiểm tra đều có vòng kháng khuẩn lớn hơn so với TET và GEN, KH6, KH10 và KH18 thể hiện độ nhạy cảm đối với CZ thấp nhất trong số 25 chủng vi khuẩn kiểm tra với vòng kháng khuẩn là 6mm. KH17 - *Micrococcus luteus* thể hiện sự nhạy cảm cao với TET (11,5mm) với GEN (6,5mm) và CZ (13mm). Akinbowale và cộng sự (2006) cho rằng vi khuẩn *Micrococcus luteus* nhạy cảm với đa số các kháng sinh đang dùng cho người và động vật hiện nay. Tuy nhiên, theo Lampert và cộng sự (2006), *Micrococcus luteus* phân lập từ san hô *Fungia scutaria* kháng lại kháng sinh TET, nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi, đa số các chủng vi khuẩn sống cùng 5 loài san hô mềm *Sinularia*

chưa có biểu hiện kháng lại TET, GEN và CZ, ngoại trừ KH 4 kháng lại CZ.

4. Phân loại vi khuẩn *Bacillus* theo KIT API 50 CHB:

Do KH4 biểu hiện hoạt tính kháng lại CZ và từ kết quả phân loại hình thái theo Bergey (1984) chủng vi khuẩn này được

xác định là vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, do đó KH4 được chạy KIT API 50 CHB (Biomérieux). Kết quả được trình bày trong bảng 6. Đối chiếu kết quả trong bảng với profile index của API 50 CHB (độ chính xác 99,7%), KH 4 được xác định là vi khuẩn *Bacillus cereus* 1.

Bảng 5. Khả năng kháng một số kháng sinh của vi khuẩn
(Bán kính vòng kháng khuẩn: mm)
Table 5. Ability of antibiotic resistance of bacteria
(Radius of inhibitable zone: mm)

Chủng	TET	GEN	CZ
KH 2	8	7	13
KH 3	8	7	13
KH 4	5,5	6	0
KH 5	8	8	12
KH 6	10	1	6
KH 7	9	8	9,5
KH 8	7,5	7,5	11,5
KH 9	9	7	13
KH 10	9	2	6
KH 11	8	7	11
KH 12	8	7	12
KH 14	KXĐ	KXĐ	KXĐ
KH 16	4	8	16
KH 17	11,5	6,5	13
KH 18	2,5	6	6
KH 19	7,5	7,5	11,5
KH 20	7,5	8	14
KH 21	7,5	8	14
KH 22	9,5	7	12
KH 23	7	7,5	17
KH 24	11	7	10
KH 25	6	6	12,5
KH 26	9	6	12
KH 27	9	8	9,5
KH 28	8	7	11

Ghi chú : KXĐ- không sinh trưởng được trên môi trường canh thang do đó không thực hiện được thí nghiệm kháng kháng sinh và không có kết quả.

Bảng 6. Khả năng sử dụng các nguồn cacbon của KH4 Gram dương (KIT API 50CHB)
Table 6. Ability of using carbon sources of KH4 + (KIT API 50CHB)

STT	Cơ chất	KH4	STT	Cơ chất	KH4
0	Đối chứng	-	25	Esculin	+
1	Glyxerol	+	26	Salixin	+
2	Erythritol	-	27	Xelobioza	+/-
3	D-Arabinosa	-	28	Mantosa	+

4	L-Araboza	-	29	Lactoza	-
5	Riboza	+	30	Melibioza	-
6	D-Xyloza	+/-	31	Saccaroza	-
7	L-Xyloza	-	32	Trehaloza	+
8	Adonitol	-	33	Inulin	-
9	B-Metyl-D-Glucosit	-	34	Melezitoza	-
10	Galactoza	-	35	Rafinoza	-
11	Glucosa	+	36	Tinh bột	+
12	Fructoza	+	37	Glycogen	+
13	Manoza	-	38	Xylitol	-
14	Sorboza	-	39	Gentiobioza	-
15	Rhamnoza	-	40	D-Turanoza	-
16	Dulxitol	-	41	D-Lyxoza	-
17	Inozitol	-	42	D-Tagatoza	-
18	Mannitol	-	43	D-Fucoza	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucoza	-
20	α -Metyl-D-Manozit	-	45	D-Arbitol	-
21	α -Metyl-D-Glucosit	-	46	L-Arabitol	-
22	N-Axetyl-Glucosamin	+	47	Gluconat	+/-
23	Amygdalin	+/-	48	2-Ketogluconat	-
24	Arbutin	+	49	5-Ketogluconat	-

Ghi chú: + dương tính (ô thử xuất hiện màu vàng), - âm tính (ô thử không đổi màu), +/- dương tính nhiều hơn âm tính (ô thử màu vàng cam), -/+ âm tính nhiều hơn dương tính (ô thử màu cam vàng).

IV. KẾT LUẬN

Đã xác định đến loài được bốn trong số năm mẫu san hô mềm dùng trong nghiên cứu bao gồm *Sinularia gibberosa* Tixier-Durivault, 1970; *Sinularia maxima* Verseveldt, 1971; *Sinularia capillosa* Tixier-Durivault, 1970; và *Sinularia mira* Tixier-Durivault, 1970.

Đã phân lập được 28 chủng vi khuẩn từ năm mẫu san hô mềm bao gồm 26 chủng thuộc ngành Firmicutes (trong đó có hai chủng thuộc Actinobacteria là xạ khuẩn KH13 và *Micrococcus luteus*) và hai chủng thuộc ngành Proteobacteria.

Trong số 25 chủng được thử nghiệm khả năng kháng Tetracycline, Gentamicin và Cefazolin, chỉ có một chủng KH4 kháng lại Cefazoline và đã được xác định là *Bacillus cereus* 1 khi dùng API 50CHB với độ chính xác 99,7%. Các chủng còn lại biểu hiện sự nhạy cảm với Cefazolin với vòng kháng khuẩn từ 6 đến 17mm. KH6 và KH10 ít nhạy cảm với Gentamicin và Cefazolin, trong khi KH18 lại ít nhạy cảm nhất đối với Tetracycline.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anand, T. P., A. W. Bhat, Y. S. Shouche, U. Roy, J. Siddharth, and S. P. Sarma, 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*, 161(3): 252-262.
- Akinbowale, O. L., H. Peng, and M. D. Barton, 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1103-1113.
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathogens*, 45: 493-496.
- Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, London, 1984. Vol. 2.
- Beleneva, I., T. Dautova, and N. Zhukova. 2005. Characterization of communities of heterotrophic bacteria associated with healthy and diseased corals in Nha

- Trang bay (Vietnam). *Microbiology*, 74: 579-587.
- Lampert, Y., D. Kelman, Y. Nitzan, and R. T. Hill, 2006. Diversity of culturable bacteria in the mucus of the Red Sea coral *Fungia scutaria*. *FEMS Microbiol Ecol.*, 58: 99-108.
- Ofwegen, L. P. van, 2000. Status of knowledge of the Indo-Pacific soft coral genus *Sinularia* May 1898 (Anthozoa: Octocorallia). *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium, Bali*. 2000. 1: 167-171.
- Ofwegen, L. P. van. 2008. The genus *Sinularia* (Octocorallia: Alcyonacea) at Palau, Micronesia. *Zool. Med. Leiden*, 82 (51): 631-735.
- Rohwer, F., M. Breitbart, J. Jara, F. Azam, and N. Knowlton, 2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral reefs*, 20: 85-91.
- Rohwer, F., V. Seguritan, F. Azam, and N. Knowlton. 2002. Diversity and distribution of coral - associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 243: 1-10.
- Romanenko, L. A., M. Uchino, N. I. Kalinovskaya, and V. V. Mikhailov. 2006. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities. *Microbiological Research*. doi: 10.1016/j.micres.2006.10.001
- Sharon, G, and E. Rosenberg, 2008. Bacterial growth on coral mucus. *Current Microbiology*, 56: 481-488.
- Tixier-Durivault, A. 1970. Les Octocoralliaires de Nha Trang (Vietnam). *Cahiers du Pacifique*, 14 : 115 – 236.
- Vacelet, E. and B. A. Thomassin, 1991. Microbial utilization of coral mucus in long term in situ incubation over a coral reef. *Hydrobiologia*, 211: 19-32.
- Verseveldt, J. 1980. A revision of the genus *Sinularia* May (Octocorallia: Alcyonacea). *Zool. Verh. Leiden*, 179: 1-128.
- Webster, N. S., and D. Bourne, 2007. Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 81-94.

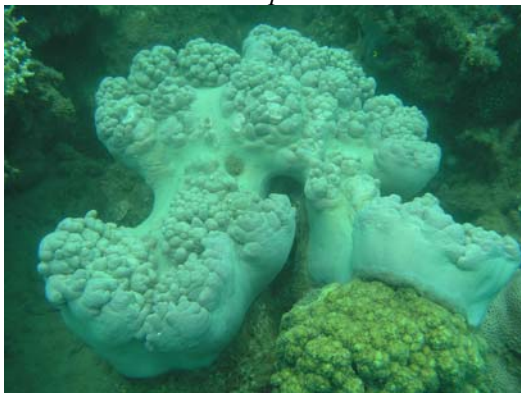
Phụ lục 1. Hình ảnh các loài san hô mềm trong nghiên cứu
Appendix 1. Soft corals in study area



Sinularia capillosa



Sinularia maxima



Sinularia gibberosa

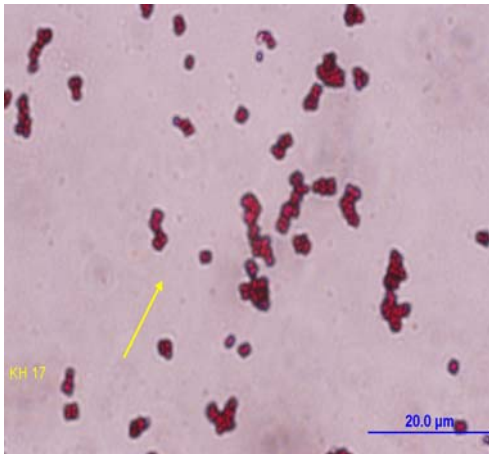


Sinularia mira

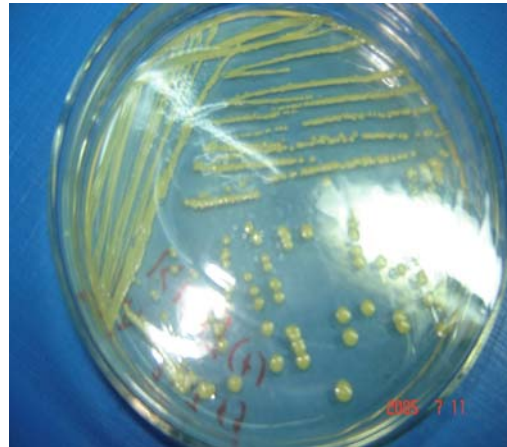


Sinularia sp.

Phụ lục 2. Hình chụp qua kính hiển vi chủng vi khuẩn KH17 và KH4
Appendix 2. The photos of bacterial strains KH17 and KH4 through the microscope



Tế bào KH 17
Cell KH17



Khuẩn lạc KH 17 (SWM)
Colony of KH17 (SWM)



Tế bào KH 4
Cell KH4



Khuẩn lạc KH 4 (SWM)
Colony of KH4 (SWM)



Kiểm tra kháng kháng sinh (KH 4 không có vòng kháng khuẩn)
Test of anti-biotic resistance (KH4 doesn't have inhibitable zone)

Phụ lục 3. Hình chụp kết quả thử nghiệm KIT đối với chủng KH4
Appendix 3. Photo of experimental result of KIT for KH4 strain



Người nhận xét:
- TS. Bùi Minh Lý
- TS. Đào Việt Hà