

**SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH KHÁNG SINH
SỐNG CÙNG SAN HỒ CỨNG *ACROPORA MURICATA*
THU TẠI VỊNH NHA TRANG**

Nguyễn Kim Hạnh, Phạm Thị Miên, Bùi Hữu Hưng, Võ Hải Thi
Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam

Tóm tắt Rạn san hô có ý nghĩa quan trọng đối với hệ sinh thái lẫn kinh tế xã hội. Tuy nhiên, một số lượng lớn rạn san hô hiện đang bị hủy hoại nghiêm trọng bởi bệnh ở san hô gây ra do vi khuẩn gây bệnh. Vì vậy, việc tìm ra những chủng vi khuẩn có khả năng sinh kháng sinh kháng lại vi khuẩn gây bệnh và bảo vệ sức khỏe san hô là việc cấp thiết trong bối cảnh hiện nay. Có 16 chủng vi khuẩn sống cùng san hô cứng (*Acropora muricata*) đã bước đầu được phân lập và thuần chủng. Bằng phương pháp cấy đường vuông góc cho thấy không có chủng vi khuẩn nào trong 16 chủng này thể hiện hoạt tính kháng lại các chủng vi khuẩn kiểm định. Để khắc phục những hạn chế trên, phương pháp khuếch tán thạch được ứng dụng để kiểm tra khả năng sinh hoạt tính của các chủng vi khuẩn phân lập. Kết quả cho thấy có 7 trong 11 chủng đem tách chiết có thể hiện khả năng sinh chất có hoạt tính kháng sinh. Trong số này hai chủng (B16 và B20) có khả năng kháng lại vi khuẩn *Serratia marcescens*, bốn chủng (B16, B17, B18 và D1) kháng vi khuẩn *Salmonella typhimurium*, hai chủng (B17 và D1) kháng vi khuẩn *Escherichia coli*, năm chủng (B16, B17, B18, B19 và D1) kháng vi khuẩn *Bacillus subtilis* và một chủng (B7) có khả năng kháng lại vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Như vậy, kết quả này chứng tỏ san hô cứng (*Acropora muricata*) tại vịnh Nha Trang có chứa nguồn vi khuẩn có khả năng sinh kháng sinh. Điều này là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu ứng dụng bảo vệ rạn san hô cũng như trong y học phục vụ chăm sóc sức khỏe con người.

**SCREENING OF CORAL ASSOCIATED BACTERIA WITH ANTIMICROBIAL
ACTIVITIES FROM SCLERACTINIAN CORAL *ACROPORA MURICATA*
IN THE NHA TRANG BAY**

Nguyen Kim Hanh, Pham Thi Mien, Bui Huu Hung, Vo Hai Thi
Institute of Oceanography, Vietnam Academy of Science & Technology

Abstract Coral reefs have important significances to ecology as well as socio-economics. However, a large number of coral reefs has been severely damaged by coral diseases which mostly caused by pathogenic bacteria. Therefore, it is urgent to find out the bacteria that is capable of producing antibiotics resistant to pathogens to protect coral health. Sixteen bacteria strains associated with the scleractinian coral *Acropora muricata* were initially isolated and purified. The results from cross-streak method showed no bacteria resisted against tested pathogens. To overcome the limitations of

this method, agar-well diffusion method was applied to examine the ability of bacterial isolations to produce antimicrobial products. The results show that 7 of 11 strains showed antimicrobial activities against pathogenic bacteria. Among of them, two strains (B16 and B20) resist to bacteria *Serratia marcescens*, four strains (B16, B17, B18 and D1) resist to *Salmonella typhimurium*, two strains (B17 and D1) resist to *Escherichia coli*, five strains (B16, B17, B18, B19 and D1) resist to *Bacillus subtilis* and one strain (B7) resists to *Vibrio parahaemolyticus*. This results show that the bacterial communities associated with the scleractinian coral *Acropora muricata* have the capacity of producing antimicrobial products. This is an important result for further research on the protection of coral health against pathogenic attacks as well as medical service for human healthcare.

I. MỞ ĐẦU

Rạn san hô có vai trò quan trọng đối với môi trường biển cũng như có ý nghĩa kinh tế cao. Tuy nhiên, hiện nay san hô đang bị tàn phá nghiêm trọng vì nhiều lý do. Các nhà khoa học đã tiên đoán rằng đến năm 2030 hơn 50% các rạn san hô trên thế giới có thể bị hủy diệt (Jackson, 2010), trong đó, bệnh là một trong những nhân tố chính đe dọa nghiêm trọng đến rạn san hô (Claremont và cs., 2011; De'ath và cs., 2012; Baird và cs., 2013). Hiện nay, có ít nhất 18 bệnh san hô đã được xác định (Rosenberg và cs., 2009; Pollock và cs., 2011) mà đa số trong chúng là do vi khuẩn gây ra. Ví dụ như: bệnh đốm trắng ở san hô *Acropora palmate* Lamarck do vi khuẩn *Serratia marcescens* gây ra (Patterson và cs., 2002; Sutherland và Ritchie, 2004) hay bệnh dải trắng II xuất hiện ở nhiều loài san hô được cho là do vi khuẩn *Vibrio charcharvina* gây ra (Ritchie và Smith, 1998). Những nghiên cứu ngoài hiện trường cũng như phòng thí nghiệm đều cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn gây bệnh trong san hô bị tẩy trắng, cụ thể là *Vibrio shiloi* trong san hô cứng, *Oculina patagonica* Angelis và *Vibrio coralliilyticus* trong *Pocillopora damicornis* Linnaeus (Kushmaro và cs., 1997; Toren và cs., 1998; Kushmaro và cs., 2001; Ben-Haim và Rosenberg, 2002). Một nghiên cứu khác cũng đưa ra giả thuyết rằng, sự thay đổi trong tương quan sinh thái giữa các thành phần loài trong quần xã vi khuẩn sống cùng san hô có thể dẫn đến

bệnh cho san hô như: bệnh dải đen, bệnh đốm trắng (Rohwer và cs., 2002). Bên cạnh đó, giả thuyết “coral probiotic” cho rằng: những thay đổi điều kiện môi trường dẫn tới thay đổi số lượng và cấu trúc của hệ vi khuẩn trong holobiont san hô và sự thay đổi này giúp san hô thích nghi với các điều kiện mới. Sự thay đổi này có thể giúp san hô chống lại bệnh và tăng sức đề kháng với một số loại vi khuẩn gây bệnh nhất định (Reshef và cs., 2006).

Các nghiên cứu đã chỉ ra san hô trong môi trường tự nhiên là một holobiont bao gồm san hô là một vật chủ và các sinh vật khác sống cùng như tảo cộng sinh, động vật nguyên sinh, vi rút, vi khuẩn, nấm, tảo si líc và thậm chí còn có nhiều thành phần khác chưa được biết (Rohwer và cs., 2002; Rosenberg và cs., 2007). Sự hình thành quần xã vi khuẩn sống cùng san hô được biết đã trải qua một quá trình chọn lọc và đồng tiến hóa lâu dài với vật chủ của chúng. Những vi sinh vật này đóng vai trò cung cấp dinh dưỡng cho san hô, như tổng hợp các hợp chất ni tơ và phốt pho mà tảo Zooxanthellae không thể tổng hợp được cho san hô vật chủ (Kushmaro và Kramarsky-Winter, 2004; Rosenberg và cs., 2009). Một số vi khuẩn khác trong holobiont san hô có khả năng kháng sinh, peptit,... (Kvennefors và cs., 2012; Shnit-Orland và cs., 2012; De Lima và cs., 2013) thông qua cạnh tranh không gian sống, hoặc cạnh tranh chất dinh dưỡng với các loài gây bệnh khác (Rypien và cs., 2010). Điều này đặt ra vấn đề nghiên cứu tìm ra các chủng vi

khuẩn sống trong san hô có khả năng kháng sinh để từ đó nghiên cứu sâu hơn, tạo ra chế phẩm sinh học hoặc có biện pháp tăng cường khả năng kháng sinh của các chủng vi khuẩn này nhằm mục đích bảo vệ rạn san hô chống lại sự phá hủy của bệnh do vi khuẩn gây bệnh gây ra.

Hiện nay, trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu, tìm hiểu vai trò của các vi khuẩn sống cùng san hô, tiêu biểu như: so sánh cấu trúc hệ vi sinh vật sống cùng san hô trong tình trạng sức khỏe san hô khác nhau của Rosenberg và cs. (2007); tìm hiểu cơ chế quy định thành phần của quần xã vi khuẩn sống cùng san hô thông qua hoạt tính kháng sinh của holobiont san hô (Kvennefors và cs., 2010); hoặc tìm hiểu tương tác đối kháng giữa các thành phần loài trong holobiont san hô (Rypien và cs., 2010). Đi sâu về hoạt tính kháng sinh của vi khuẩn sống trong san hô, đã có các công trình nghiên cứu về sự đa dạng và tiềm năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn sống trong san hô (*Alcyonium digitatum* Linnaeus) ở biển Baltic của Phạm và cs. (2015). Nghiên cứu tìm thành phần kháng sinh trong vi khuẩn *Pseudoalteromonas* sp. sống trong san hô tám tia do Martinez-Luis và cs. (2011). Ngoài ra, còn có nghiên cứu tìm nguồn vi khuẩn có hoạt tính kháng sinh từ nhiều loài san hô khác nhau tại vùng biển Indonesia của Radjasa và cs. (2008); nghiên cứu về hoạt động kháng khuẩn của vi khuẩn *Pseudoalteromonas* sp. trong holobiont san hô của Shnit-Orland và cs. (2012). Tại Việt Nam, hiện nay, các công trình nghiên cứu về đặc điểm sinh thái cũng như tìm hoạt tính kháng sinh từ quần xã vi khuẩn sống cùng san hô vẫn còn hạn chế. Điều này đặt ra nhu cầu cấp thiết cần có các nghiên cứu về vi khuẩn trong san hô ở biển Việt Nam, trong đó có vịnh Nha Trang.

II. PHƯƠNG PHÁP

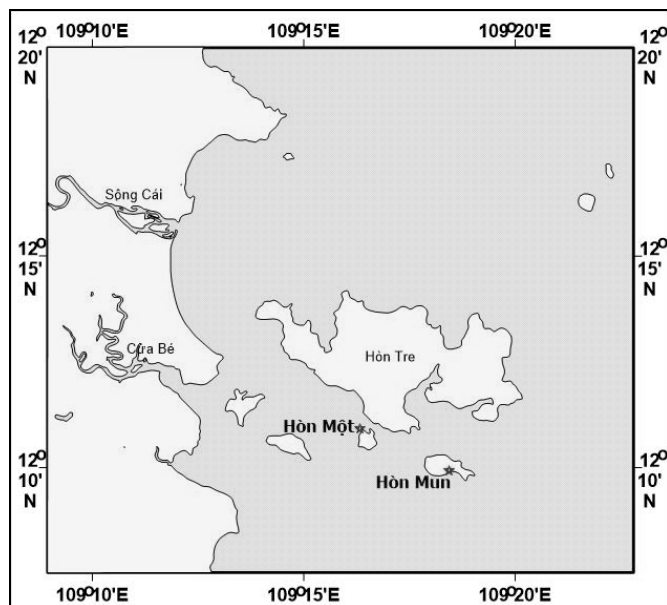
1. Địa điểm và đối tượng nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu thuộc vịnh Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa. Hai điểm thu mẫu gồm: Hòn Một (12,18⁰N; 109,27⁰E) và Hòn Mun

(12,16⁰N; 109,31⁰E) được thể hiện trên Hình 1. San hô cành *Acropora muricata* được lựa chọn là đối tượng nghiên cứu. Mẫu cành san hô được thu trực tiếp dưới nước bằng phương pháp cắt cành bởi các thợ lặn có khí tài (SCUBA) ở độ sâu 5 - 7 m. Mỗi cành có kích thước khoảng 10 đến 15 cm. Tại mỗi khu vực thu mẫu, thu 3 cành tại các vị trí khác nhau của một tập đoàn san hô duy nhất. Mẫu sau khi thu được giữ trong ống falcon đã khử trùng có chứa nước biển vô trùng (đã lọc qua màng lọc 0,2 μ m) và được bảo quản trong thùng đá ở nhiệt độ 4°C trước khi vận chuyển về phòng thí nghiệm tại Viện Hải dương học.

2. Phương pháp xử lý và phân lập vi khuẩn từ mẫu san hô

Tại phòng thí nghiệm, mẫu san hô được rửa nhanh với cồn 96%, cân khối lượng mẫu và nghiền nhuyễn mẫu trong cối sứ đã được khử trùng. Mẫu sau khi nghiền được hòa loãng với nước biển đã lọc qua màng lọc 0,2 μ m với tỉ lệ 1 g mẫu: 9 ml nước biển lọc. Xử lý mẫu trên máy Ultrasonic processor (Cole-Parmer) để tách hoàn toàn vi khuẩn trong san hô ra khỏi mô xương, mô cơ và cả chất nhầy. Mẫu san hô sau đó được cấy trang vào đĩa Petri chứa môi trường Nutrient Agar (NA) đã chuẩn bị sẵn để nuôi cấy, phân lập và làm thuần các chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn sau khi làm thuần được xác định Gram bằng KOH (Halebian và cs., 1981). Bên cạnh vi khuẩn dị dưỡng, vi khuẩn *Vibrio* sp. cũng được phân lập theo phương pháp đổ đĩa của Pfeffer và cs. (2003). Môi trường thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS) được sử dụng là môi trường đặc hiệu cho *Vibrio* sp. Khi các đĩa TCBS đã có chủng vi khuẩn phát triển khuẩn lạc rời và thuần, tiến hành định danh một số loài bằng môi trường đặc hiệu loài CHROMagar. Môi trường CHROMagar có khả năng định danh các loài *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* và *Vibrio alginolyticus* dựa vào màu sắc khuẩn lạc (Bảng 1).



Hình 1. Vị trí thu mẫu (đánh dấu sao đỏ) tại vịnh Nha Trang
Fig. 1. Location of sampling sites (red stars) in the Nha Trang bay

Bảng 1. Hình thái *Vibrio* sp. trên môi trường TCBS và CHROMagar
Table 1. The morphology of *Vibrio* sp. on TCBS and CHROMagar plates

Tên loài	Đặc điểm nhận biết trên môi trường CHROM agar	Đặc điểm nhận biết trên môi trường TCBS
<i>Vibrio parahaemoliticus</i>	Khuẩn lạc màu tím nhạt	Khuẩn lạc có tâm màu xanh lá cây đậm hơn màu môi trường, đường kính khuẩn lạc từ 3 - 4 mm
<i>Vibrio cholera</i>	Khuẩn lạc màu ngọc lam	Khuẩn lạc đẹp màu vàng, chuyển màu môi trường từ xanh sang vàng, đường kính khuẩn lạc từ 2 - 3 mm
<i>Vibrio vulnificus</i>	Khuẩn lạc màu ngọc lam	Khuẩn lạc màu xanh đen, phát quang, đường kính từ 3 - 4 mm

3. Phương pháp kiểm định vòng kháng khuẩn bằng cách cấy đường vuông góc

Các chủng vi khuẩn thuần (vi khuẩn cần kiểm định) được cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng NA theo một đường thẳng ở giữa đĩa thạch bằng que cấy vòng và ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong vòng 24 giờ để vi khuẩn phát triển. Sau đó, các đường vi khuẩn kiểm định (vi khuẩn gây bệnh) được cấy vuông góc với vi khuẩn cần kiểm định bằng que cấy vòng (Nguyễn Lân Dũng và cs., 1997). Vi khuẩn kiểm định

trong nghiên cứu này bao gồm các vi khuẩn gây bệnh phổ biến sau: *Serratia marcescens* PDL100 (ATCC BAA-632), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella typhimurium* (ATCC 6994), *Escherichia coli* O157 (Micro-genomics), *Vibrio parahaemoliticus* (phân lập từ san hô *Acropora muricata*), *Vibrio cholera* (phân lập từ san hô *A. muricata*), *Vibrio vulnificus* (phân lập từ san hô *A. muricata*). Quan sát sự xuất hiện hay không của khoảng cách kháng khuẩn giữa vi khuẩn kiểm định và cần kiểm định sau 24h nuôi cấy.

4. Phương pháp khuếch tán thạch

Trước tiên, vi khuẩn kiểm định và cần kiểm định được nuôi cấy tăng sinh. Sau khi nuôi cấy, các chất hoạt tính từ vi khuẩn cần kiểm định được chiết bằng dung dịch ethyl acetat. Sau khi bổ sung ethyl acetat, mẫu được xử lý với máy Ultrasonic processor (Cole-Parmer) để phá vỡ cấu trúc tế bào vi khuẩn, giải phóng hoàn toàn các chất nội bào ra môi trường. Tiếp theo, dùng bình chiết thủy tinh tách lấy ethyl acetat và để bay hơi tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Sau khi ethyl acetat đã bay hơi hoàn toàn để lấy chất chiết nội bào vi khuẩn. Môi trường Müller-Hinton agar (MHA) được dùng trong phương pháp khuếch tán thạch (Bauer và cs., 1966). Ban đầu, vi khuẩn kiểm định được cấy vào đĩa thạch. Sau đó, tiến hành đục giếng thạch bằng dụng cụ vô trùng. Hút dịch chiết đã được hòa tan với methanol vào các giếng thạch và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Đọc kết quả nếu xuất hiện vòng kháng khuẩn là có hoạt tính kháng khuẩn, tiến hành đo kích thước vòng kháng khuẩn (mm).

5. Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả được tính toán, trình diễn đồ thị bằng phần mềm Excel. Kiểm nghiệm ANOVA một chiều được sử dụng để so sánh sự khác nhau về số lượng vi khuẩn phân lập được giữa các mẫu. Phân tích Turkey-Kramer được tiến hành kiểm nghiệm sự khác nhau giữa từng cặp mẫu sau khi kiểm nghiệm ANOVA một chiều cho kết quả khác nhau có ý nghĩa trong nhóm mẫu kiểm nghiệm. Kiểm nghiệm ANOVA hai chiều được sử dụng để đánh giá yếu tố có ảnh hưởng hơn đến kích thước vòng kháng khuẩn giữa các chủng phân lập từ san hô. Các phân tích và đồ thị trình diễn kết quả kiểm nghiệm thống kê từ các phân tích trên được thực hiện trên phần mềm RStudio-0.99.902.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

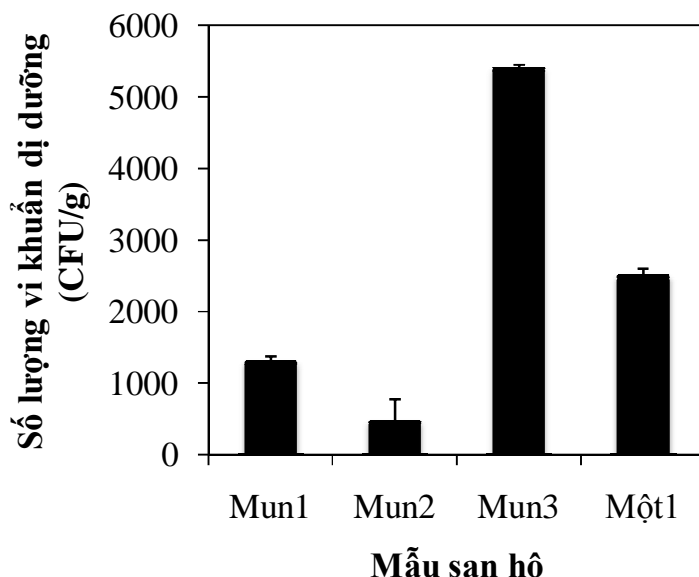
1. Số lượng vi khuẩn dị dưỡng phân lập được trong san hô

Tổng số khuẩn lạc của các vi khuẩn dị dưỡng trong san hô phân lập được trên đĩa thạch dao động từ 470 - 5.400 CFU/g (Hình 2). Kết quả cho thấy, các cảnh san hô ở các tập đoàn san hô khác nhau thu tại các địa điểm và thời gian khác nhau thì khác nhau về số lượng vi khuẩn dị dưỡng nuôi cấy được. Các khác nhau này là có ý nghĩa thống kê (ANOVA một chiều; $F = 70,2$; $P < 0,001$); trong đó, mẫu san hô Mun₃ thu tại đảo Hòn Mun vào ngày 20/02/2016 có số lượng khuẩn lạc cao nhất (5.400 ± 50 CFU/g) và cao gấp lần lượt khoảng 4, 11 và 2 lần so với mẫu Mun₁, Mun₂ và Một theo tuần tự. Các sự sai khác từng cặp này đều có ý nghĩa thống kê (Turkey-Kramer, $P < 0,05$).

Tuy các mẫu phân tích đều từ một loài san hô cứng *A. muricata* nhưng số lượng vi khuẩn lại khác nhau giữa các lô mẫu. Sự khác nhau này có thể do một số nguyên nhân. Một số nghiên cứu cho thấy các mẫu san hô tuy cùng loài nhưng có số lượng vi khuẩn khác nhau khi chúng phân bố ở những địa điểm khác nhau và số lượng này cũng biến động theo từng thời điểm khác nhau trong một năm và mỗi đợt thu mẫu (Bythell và Wild, 2011). Sự khác nhau có thể liên quan đến thể trạng của mỗi cá thể san hô, dẫn đến lựa chọn hệ vi khuẩn khác nhau về số lượng và cấu trúc. Một số nghiên cứu khác cho thấy, lớp nhầy của san hô ảnh hưởng rất lớn đến số lượng và cấu trúc của vi khuẩn (Nguyen-Kim và cs., 2014). Cụ thể là, lớp chất nhầy của cùng một loài san hô có thể khác nhau về thành phần cấu tạo nên chúng, độ dày và độ nhớt. Và những yếu tố này có thể thay đổi theo mùa, theo tháng và địa điểm thu mẫu (Bythell và Wild, 2011). Ngoài ra, khi so sánh với các nghiên cứu trước đây, số lượng vi khuẩn dị dưỡng phân lập được trong nghiên cứu này là ít hơn. Chẳng hạn, trong nghiên cứu của Rosenberg và cs. (2007), số lượng này được ước tính dao động từ 10^5 đến 10^6 CFU/ml. Sự khác biệt này có thể vì đối tượng nghiên cứu là các loài san hô khác nhau. Bên cạnh đó, một nguyên nhân nữa có thể do trong môi

trường phân lập NA là môi trường dinh dưỡng cơ bản và nó chỉ cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết nhất mà không có tất cả các thành phần muối vô cơ khác có trong nước biển và trong san hô. Vì vậy, một số loài vi khuẩn sống cùng san hô có thể chưa

có điều kiện tốt nhất của chúng để phát triển. Mặt khác, điều kiện phân lập và nuôi cấy vi khuẩn có thể chưa đạt đến mức tối ưu như trong môi trường tự nhiên (nhiệt độ 25 - 28°C, hàm lượng O₂ thấp,...).



Hình 2. Biểu đồ cột của số lượng vi khuẩn dị dưỡng của 4 mẫu san hô. Các cột được trình diễn bởi giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (n = 3)

Fig. 2. The abundance of bacterial cultures in 4 coral samples. Bargraph is presented as mean values and standard deviation (n = 3)

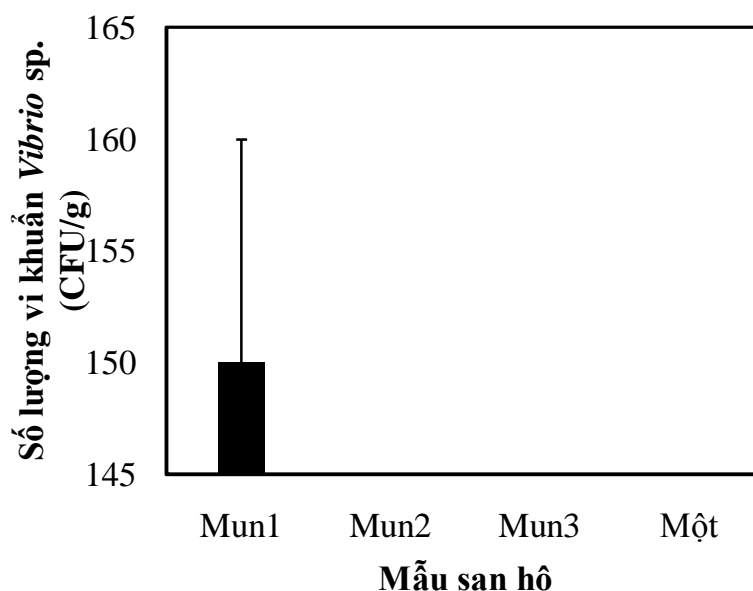
Các khuẩn lạc vi khuẩn từ các mẫu san hô không những biểu hiện sự khác biệt về số lượng mà còn đa dạng về màu sắc (trắng, cam, hồng, vàng,...), hình dạng và kích thước trên các đĩa thạch. Kích thước khuẩn lạc dao động từ 0,05 đến 0,9 mm. Sau khi quan sát các khuẩn lạc trên tất cả bốn mẫu san hô trên, chúng tôi đã chọn ra 16 khuẩn lạc có sự khác biệt rõ ràng nhất về màu sắc, hình dạng và kích thước để tiến hành các phân tích tiếp theo. Mười sáu chủng này sau đó được tiến hành xác định Gram bằng dung dịch KOH 3%. Kết quả cho thấy có 14 chủng vi khuẩn là Gram dương (+), chiếm 87,5% và 2 chủng vi khuẩn Gram (-) chiếm 12,5%. Các chủng này được kí hiệu như sau: B1, B2, B4, B5, B7, B9 (từ mẫu Mun₁); B15, B16, B17, B18, B19, B20 (từ mẫu Mun₂); D1, D2, D3, D4 (từ mẫu Mun₃).

2. Số lượng vi khuẩn *Vibrio* trong san hô

Trong số bốn mẫu san hô phân tích, chỉ duy nhất mẫu Mun₁ cho thấy có sự xuất hiện của vi khuẩn *Vibrio*. Số lượng vi khuẩn *Vibrio* phân lập được trong mẫu san hô này là 150 CFU/g (Hình 3). Số lượng này ít hơn 8,66 lần so với số vi khuẩn dị dưỡng phân lập từ cùng mẫu san hô. Theo quan sát trong quá trình thu mẫu, không có mẫu san hô nào có dấu hiệu nhiễm bệnh. Tuy nhiên, trong mẫu Mun₁ vẫn phát hiện sự hiện diện của các chủng *Vibrio*. Như vậy, trong điều kiện sức khỏe bình thường, san hô vẫn có thể sống cùng với vi khuẩn gây bệnh cơ hội với số lượng nhất định mà chưa đạt đến ngưỡng gây bệnh cho san hô vật chủ. Khi một trong các điều kiện môi trường sống thay đổi (nhiệt độ, a xít, ô nhiễm,...), hệ vi khuẩn trong san hô có thể bị biến đổi, đứt gãy cấu

trúc và sự cân bằng, một số vi khuẩn “có lợi” nhưng nhạy cảm với các thay đổi có thể biến mất, dẫn đến mất các chức năng bảo vệ san hô. Và kết quả có thể là cơ hội cho các vi khuẩn gây bệnh thống lĩnh và phát triển mạnh mẽ. Hậu quả có thể gây ra bệnh của san hô hoặc xấu hơn là sự tử vong ở san hô.

Trong các khuẩn lạc *Vibrio* phân lập được, tám khuẩn lạc có hình dạng và màu sắc khác nhau đã được quan sát. Cụ thể, các chủng này được kí hiệu như sau: C1, A1, A2, A5, A7, A9, A10, A11. Ba khuẩn lạc có màu xanh lục, một khuẩn lạc có màu xám trắng và bốn khuẩn lạc có màu vàng. Đường kính khuẩn lạc dao động từ 0,1 đến 1,3 cm.



Hình 3. Số lượng vi khuẩn *Vibrio* sp. của 4 mẫu san hô khác nhau. Cột được biểu diễn bởi giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (n = 3)

Fig. 3. The abundance of isolated *Vibrio* sp. in 4 coral samples. Bargraph is presented as mean values and standard deviation (n = 3)

3. Định danh vi khuẩn *Vibrio* bằng môi trường CHROM agar

Các chủng *Vibrio* sp. sau khi làm thuần trên đĩa TCBS sẽ được phân loại định danh một số loài bằng môi trường CHROM agar. Kết quả: ở chủng A5 khuẩn lạc trên đĩa CHROM có màu ngọc lam và màu xanh đen trên đĩa TCBS nên là loài *Vibrio vulnificus*. Chủng C1 khuẩn lạc trên đĩa CHROM có màu tím nhạt và màu xanh đậm trên đĩa TCBS là loài *Vibrio parahaemolyticus* và chủng A11 khuẩn lạc trên đĩa CHROM có màu ngọc lam và màu vàng trên đĩa TCBS là *Vibrio cholerae*. Đây là các chủng vi khuẩn gây bệnh trên san hô *Pocillopora damicornis* (Ben-Haim và Rosenberg, 2002), gây bệnh dải vàng trên

san hô ngầm (Cervino và cs., 2008), gây bệnh đốm/dải vàng trên san hô (Cervino và cs., 2004) và bệnh dải đen trên san hô (Arotsker và cs., 2009). Kết quả này rất quan trọng, vì lần đầu tiên ở Việt Nam đã đưa ra được Danh mục một số loài vi khuẩn gây bệnh thuộc nhóm *Vibrio* trong san hô cứng. Đây là tiền đề cho các đề tài trong việc nghiên cứu về điều kiện, yếu tố có thể “kích hoạt” sự phát triển của các nhóm vi khuẩn này mà kết quả là san hô vật chủ bị nhiễm bệnh/tử vong. Một trong những hạn chế của phương pháp này là chỉ định danh được bốn loài *Vibrio* nên năm chủng còn lại vẫn chưa được định danh đến loài và sẽ được nghiên cứu thêm bằng các phương pháp hiện đại hơn như sinh học phân tử.

4. Thử hoạt tính kháng sinh của vi khuẩn dị dưỡng bằng phương pháp cây đường vuông góc

Mười sáu chủng vi khuẩn dị dưỡng sau khi thuần đã được thử hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp cây vuông góc với các chủng vi khuẩn kiểm định (gây bệnh): *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* và *Vibrio vulnificus*. Kết quả kiểm định đường vuông góc không cho một kết quả dương tính nào, nghĩa là không có khoảng cách kháng khuẩn nào giữa các đường cây vuông góc được quan sát và ghi nhận (Hình 4A). Kết quả này có thể do một số nguyên nhân. Có thể tất cả các loài vi khuẩn phân lập được từ san hô này đều là những vi khuẩn sinh các chất kháng sinh nội bào và các chất này không được vận chuyển ra ngoài tế bào. Các chất kháng sinh này có thể không đóng vai trò giúp vi khuẩn hấp thụ chất dinh dưỡng ngoại bào hay tấn công đối kháng các sinh vật khác mà nó có chức năng bảo vệ tế bào vi khuẩn không bị xâm nhập từ bên ngoài bởi các tác nhân gây bệnh. Mặt khác, lượng chất kháng sinh sản sinh từ một đường cây mỏng của vi khuẩn phân lập trong san hô có thể chưa đủ lớn để có tác động ức chế sự phát triển của các vi khuẩn kiểm định (gây bệnh). Để khắc phục một số hạn chế trong phương pháp này, phương pháp khuếch tán đã được ứng dụng song song để kiểm định khả năng sinh kháng sinh của các chủng vi khuẩn.

5. Thử hoạt tính kháng sinh của vi khuẩn dị dưỡng bằng phương pháp khuếch tán thạch

Phương pháp tách chiết dịch nội bào của các chủng vi khuẩn và kiểm định hoạt tính của các chất đối với các vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp khuếch lỗ thạch được áp dụng sau khi phương pháp cây đường vuông góc không cho kết quả dương tính. Trong mười sáu chủng đã chọn lựa trong tổng các vi khuẩn phân lập được trong san hô, đã tiến hành tách chiết 11 chủng. Kết quả cho thấy có 7/11 chủng thể hiện hoạt

tính kháng khuẩn với các vi khuẩn gây bệnh kiểm định, với vòng kháng khuẩn rõ ràng (Hình 4B), được kí hiệu là: B7, B16, B17, B18, B19, B20 và D1. Đa số các chủng này được phân lập từ mẫu san hô *Mun₂* thu tại đảo Hòn Mun vào ngày 20/02/2016. Như vậy, tỷ lệ số chủng kháng khuẩn trên tổng số chủng kiểm định là khoảng 63,6%. Tỷ lệ này cao hơn với tỷ lệ tìm được ở nghiên cứu của Rypien và cs. (2010). Tác giả cho thấy ở 31⁰C có tỷ lệ 52,2% chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng sinh kháng lại vi khuẩn gây bệnh. Theo nghiên cứu của Phạm và cs. (2015) trên loài san hô mềm *Alcyonium digitatum* ở biển Baltic cho thấy tỷ lệ 48% các loài phân lập được có hoạt tính kháng khuẩn. Còn ở nghiên cứu của Shnit-Orland và cs. (2012) cho thấy ở 27⁰C chỉ có 4,6% số vi khuẩn phân lập được có hoạt tính kháng khuẩn chống lại vi khuẩn *Vibrio coralliilyticus* gây bệnh.

Trong 7 chủng có hoạt tính này, có 2 chủng (B16 và B20) có khả năng kháng lại vi khuẩn *S. marcescens* với vòng kháng khuẩn dao động từ 0,3 - 3,2 mm (Hình 5A), bốn chủng (B16, B17, B18 và D1) kháng lại vi khuẩn *S. typhimurium* (Hình 5B) với bán kính vòng kháng khuẩn từ 0,4 - 4,6 mm, 2 chủng B17 và D1 kháng lại vi khuẩn *E. coli* (Hình 5C) với bán kính vòng kháng khuẩn dao động từ 0,8 - 4,7 mm, 5 chủng (B16, B17, B18, B19 và D1) có khả năng kháng lại vi khuẩn *B. subtilis* (Hình 5D) với vòng kháng khuẩn dao động từ 0,8 - 2,6 mm và có 1 chủng B7 có khả năng kháng lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Hình 5E) với bán kính vòng kháng khuẩn dao động từ 0,7 - 1,5 mm. Không có chủng nào được tìm thấy có khả năng kháng 2 chủng *Vibrio vulnificus* và *Vibrio cholerae*.

Trong số các chủng có khả năng kháng khuẩn, chủng B16 có khả năng kháng mạnh nhất có ý nghĩa thống kê đối với vi khuẩn *Salmonella typhimurium* (kích thước vòng kháng khuẩn = 3,7 mm) (ANOVA một chiều, $P < 0,001$). Đặc biệt, chủng vi khuẩn này và chủng B20 có khả năng kháng lại vi khuẩn *Serratia marcescens* (kích thước

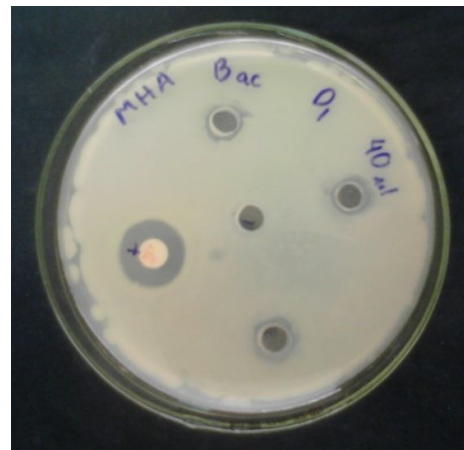
vòng kháng khuẩn tương ứng là 2,7 mm và 0,4 mm). Đây là một kết quả có ý nghĩa quan trọng vì *Serratia marcescens* đã được tìm thấy là nguyên nhân gây ra bệnh đốm trắng ở san hô *Acropora palmata* (Patterson và cs., 2002; Sutherland và Ritchie, 2004). Bên cạnh đó, chủng B7 là chủng duy nhất có khả năng kháng đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* – là vi khuẩn gây bệnh phân lập được từ san hô *A. muricata* trong đề tài này.

Phân tích ANOVA hai chiều (Bảng 2) cho thấy kích thước vòng kháng khuẩn khác nhau tùy thuộc vào từng loài vi khuẩn dị dưỡng khác nhau cũng như đối với từng loài vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Cả hai yếu tố ảnh hưởng này đều có ý nghĩa thống kê; trong đó, vi khuẩn dị dưỡng có mức độ ảnh hưởng đến sự khác nhau về kích thước vòng kháng khuẩn ($P = 8,87 \times 10^{-11}$) nhiều hơn so với vi khuẩn gây bệnh ($P = 0,01$). Tuy nhiên, kích thước trung bình của vòng kháng khuẩn trong nghiên cứu này thấp so với một số nghiên cứu trước đó. Ví dụ như trong nghiên cứu của Martinez-Luis và cs. (2011) khi chiết xuất các hợp chất từ vi khuẩn và thử nghiệm tính đối kháng cho thấy đường kính vòng kháng đối với vi khuẩn *Bacillus subtilis* trung bình là 23 mm, còn đối với vi khuẩn *Vibrio* sp. bán

kính vòng kháng trung bình là 18,16 mm. Hoạt tính kháng sinh thấp như vậy có thể do các nguyên nhân: vi khuẩn khi nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng NA thiếu các dưỡng chất vi lượng so với trong nước biển và san hô khiến chúng không thể tổng hợp đầy đủ các chất có hoạt tính kháng sinh, một số chất có hoạt tính kháng sinh có thể không hòa tan trong dung môi ethyl acetat, lượng dịch chiết (30 μ l) bỏ vào mỗi giếng thạch chưa đủ nên thể hiện hoạt tính kháng sinh yếu. Tuy nhiên, những kết quả sàng lọc ban đầu trong đề tài vẫn đóng vai trò quan trọng và là tiền đề cho các nghiên cứu về cơ chế kháng bệnh ở san hô của các vi khuẩn sống cùng cũng như có ý nghĩa ứng dụng trong nghiên cứu y học trong việc sản xuất các chất kháng sinh mới kháng lại các vi khuẩn gây bệnh phổ biến ở người. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ được tiến hành để định danh các chủng tìm thấy có khả năng sinh chất hoạt tính. Cụ thể, các phản ứng sinh hóa (catalase, oxidase, chuyển hóa citrate, phân giải ure, khử nitrate, phân giải hồng cầu, hóa lỏng gelatin, coagulase, sinh idol, MR, VP, lên men đường: MPN, sinh H₂S, TSI) sẽ được tiến hành phân tích và các phương pháp sinh học phân tử hiện đại sẽ được áp dụng để định danh các chủng này.



A.



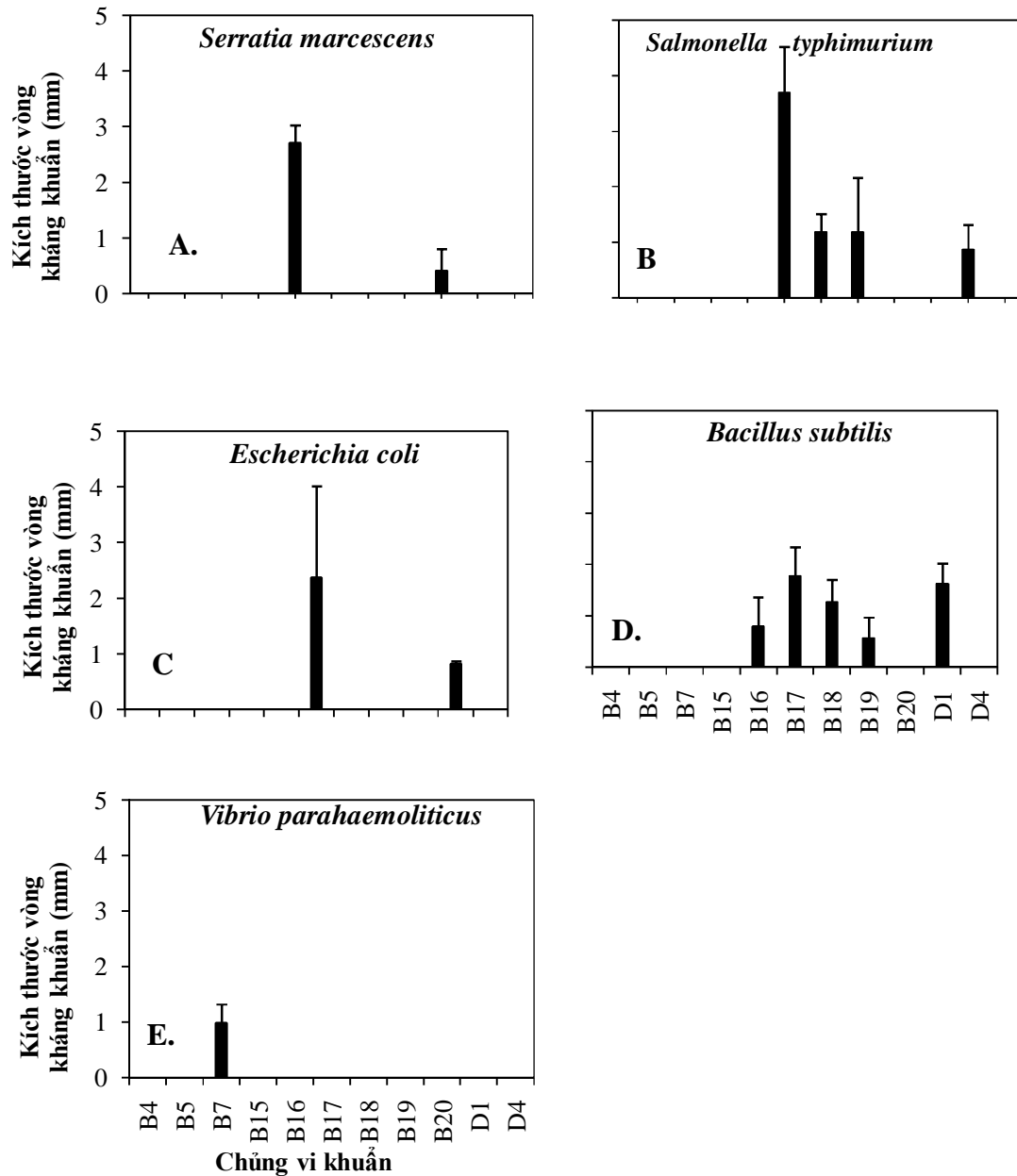
B.

Hình 4. (A) Hình ảnh đại diện kết quả cấy vuông góc giữa chủng B₂₀ và bảy chủng vi khuẩn kiểm định không phát hiện khoảng cách kháng khuẩn

(B) Kết quả dương tính bằng phương pháp khuếch tán thạch

Fig. 4. (A). Photos of a cross-streak test with no antimicrobial distance

(B) Photos of an agar-well diffusion test with antimicrobial distances



Hình 5. Đồ thị kết quả kích thước vòng kháng khuẩn (mm) giữa các chủng cần kiểm định và các chủng kiểm định (gây bệnh): *S. marcescens* (A), *S. typhimurium* (B), *E. coli* (C), *B. subtilis* (D) và *V. parahaemolyticus* (E). Số liệu được trình bày ở dạng số trung bình và độ lệch chuẩn (n = 3)

Fig. 5. Radius (mm) of the inhibited zone to the pathogenic bacteria: *S. marcescens* (A), *S. typhimurium* (B), *E. coli* (C), *B. subtilis* (D) and *V. parahaemolyticus* (E). Bargraphs are presented as mean values and standard deviation (n = 3)

Bảng 2. Kết quả phân tích ANOVA hai chiều nhằm phân tích mức độ ảnh hưởng của vi khuẩn kiểm định và vi khuẩn cần kiểm định lên kích thước vòng kháng khuẩn

Table 2. The output of twoway ANOVA in detecting the factor that affects the size of inhibition zone

	Sai khác	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Kiểm định	Giá trị P(>F)
Vi khuẩn dị dưỡng	11	38,888	3,3553	7,7873	$8,87 \times 10^{-11}$
Vi khuẩn gây bệnh	4	5,837	1,4592	3,2142	0,01428
Phần dư	164	74.453	0.4540		

IV. KẾT LUẬN

Từ 4 mẫu san hô ban đầu, đã phân lập được lượng vi khuẩn dị dưỡng từ $4,7 \times 10^2$ - $5,4 \times 10^3$ CFU/g, vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* là $1,5 \times 10^2$ CFU/g. Từ các vi khuẩn phân lập được, thuần khiết được 16 chủng vi khuẩn dị dưỡng và 8 chủng vi khuẩn thuộc chi *Vibrio*. Trong số 8 chủng vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* định danh được ba chủng: chủng A5 là loài *Vibrio vulnificus*, C1 là loài *Vibrio parahaemolyticus* và chủng A11 là *Vibrio cholerae*. Có 2/16 chủng vi khuẩn dị dưỡng phân lập được là Gram âm (-) chiếm tỷ lệ 12,5% và 14/16 chủng vi khuẩn dị dưỡng là Gram dương (+) chiếm tỷ lệ 87,5%. Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* đều là Gram âm (-). Không có chủng vi khuẩn dị dưỡng nào thể hiện kết quả dương tính khi thử nghiệm hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp cấy đường vuông góc. Trong số 11 chủng vi khuẩn dị dưỡng thử hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp tách chiết và khuếch tán thạch có 7 chủng có hoạt tính ở các mức độ khác nhau chiếm tỷ lệ 63,64%. Trong số các chủng có hoạt tính kháng sinh, có hai chủng (B16 và B20) có khả năng kháng lại vi khuẩn *S. marcescens*, bốn chủng (B16, B17, B18 và D1) kháng lại vi khuẩn *S. typhimurium*, hai chủng (B17 và D1) kháng lại vi khuẩn *E. coli*, năm chủng (B16, B17, B18, B19 và D1) có khả năng kháng lại vi khuẩn *B. subtilis* và một chủng B7 có khả năng kháng lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Tóm lại, đề tài đã tìm kiếm được các chủng vi khuẩn sống cùng san hô cứng *Acropora muricata* thu tại vịnh Nha Trang có hoạt tính kháng sinh. Kết quả đã khẳng định lại một lần nữa rằng hệ vi sinh vật trong holobiont san hô có những loài có hoạt tính kháng sinh, đồng thời kết quả cũng cho thấy các rạn san hô cứng *Acropora muricata* tại vịnh Nha Trang có chứa nguồn vi sinh vật có khả năng kháng sinh. Điều này là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu tiếp sau tìm hiểu rõ hơn về thành phần loài vi khuẩn, thành phần hoạt chất kháng sinh, cơ chế tiết chất kháng sinh,... nhằm ứng dụng các kết quả này vào bảo vệ rạn san hô cũng như ứng dụng trong y học phục vụ chăm sóc sức khỏe con người.

Lời cảm ơn. Bài báo sử dụng một phần số liệu của đề tài VAST 06.02/16-17. Tập thể tác giả xin cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arotsker L., N. Siboni, E. Ben-Dov, E. Kramarsky-Winter, Y. Loya, A. Kushmaro, 2009. *Vibrio* sp. as a potentially important member of the black band disease (BBD) consortium in *Favia* sp. corals. FEMS Microbiological Ecology, 70(3): 515 - 524.
- Baird A. H., M. S. Pratchett, A. S. Hoey, Y. Herdiana, and S. J. Campbell, 2013.

- Acanthaster planci* is a major cause of coral mortality in Indonesia. *Coral Reefs*, 32: 803 - 812.
- Bauer A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turck, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathogens*, 45: 493 -496.
- Ben-Haim Y., E. Rosenberg, 2002. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 141: 47 - 55.
- Bythell J. C. and C. Wild, 2011. Biology and ecology of coral mucus release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408: 88-93.
- Cervino J. M., L. H. Raymond, W. P. Shawn, S. C. Polson, T. J. Goreau, R. J. Martinez, G. W. Smith, 2004. Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in Caribbean corals. *Environmental Microbiology*, 70: 6855 - 6864.
- Cervino J. M., F. L. Thompson, B. Gomez-Gil, E. A. Lorence, T. J. Goreau, R. L. Hayes, K. Winiarski-Cervino, G. W. Smith, K. A. Huguen, E. Bartels, 2008. The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. *Microbiology*, 105: 1658 - 1671.
- Claremont M., S. T. Williams, T. G. Barraclough, D. G. Reid, 2011. The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *Journal of Biogeography*, 38: 1016 - 1032.
- De Lima L. A., L. Migliolo, C. Barreiro e Castro, D. D. Pires, C. Lopez-Abarrategui, E. F. Goncalves, I. M. Vasconcelos, J. T. A. de Oliveira, A. D. J. Otero-Gonzalez, O. L. Franco, S. C. Dias, 2013. Identification of a novel antimicrobial peptide from Brazilian coast coral *Phyllogorgia dilatata*. *Protein and Peptide Letters*, 20: 1153 - 1158.
- De'ath G., K. E. Fabricius, H. Sweatman, M. Puotinen, 2012. The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 17995 - 17999.
- Haleblian S., B. Harris, S. M. Finegold, R. D. Rolfe, 1981. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 13: 444 - 448.
- Jackson J. B. C., 2010. The future of the oceans past. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 365: 3765 - 3778.
- Kushmaro A., E. Rosenberg, M. Fine, Y. Loya, 1997. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series*, 147: 159 - 165.
- Kushmaro A., E. Banin, Y. Loya, E. Stackebrandt, E. Rosenberg, 2001. *Vibrio shiloi* sp nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1383 - 1388.
- Kushmaro A., E. Kramarsky-Winter, 2004. Bacteria as a source of coral nutrition. In: Rosenberg E., Loya Y. (eds). *Coral health and disease*. Springer, Berlin, 231 - 242.
- Kvennefors E. C. E., E. M. Sampayo, T. Ridgway, A. C. Barnes, O. Hoegh-Guldberg, 2010. Bacterial communities of two ubiquitous Great Barrier reef corals reveal both site - and species - Specificity of common bacterial associates. *Plos One*, 5: e10401.
- Kvennefors E. C. E., E. Sampayo, C. Kerr, G. Vieira, G. Roff, A. C. Barnes, 2012. Regulation of bacterial communities through antimicrobial activity by the coral holobiont. *Microbial Ecology*, 63: 605 - 618.
- Martinez-Luis S., J. Ballesteros, M. Gutierrez, 2011. Antibacterial consti-

- tuents from the octocoral associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. *Revista Latinoamericana de Química*, 39: 1 - 2.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyên và Phạm Văn Ty, 1997. *Vi sinh vật học*. Nhà Xuất bản Giáo dục, tr. 375 - 380.
- Nguyen-Kim H., T. Bouvier, C. Bouvier, D. N. Hai, N. N. Lam, E. Rochelle-Newall, A. C. Baudoux, C. Desnues, S. Reynaud, C. Ferrier-Pages, Y. Bettarel, 2014. High occurrence of viruses in the mucus layer of scleractinian corals. *Environmental Microbiology Reports*, 6: 675 - 682.
- Patterson K. L., J. W. Porter, K. E. Ritchie, S. W. Polson, E. Mueller, E. C. Peters, D. L. Santavy, G. W. Smith, 2002. The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 8725 - 8730.
- Pfeffer C. S., M. F. Hite, J. D. Oliver, 2003. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern North Carolina. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3526 - 3531.
- Pham T. M., J. Wiese, A. Wenzel-Storjohann, J. F. Imhoff, 2015. Diversity and antimicrobial potential of bacteria isolates associated with the soft coral *Alconium digitatum* from the Baltic sea. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109: 105 - 119.
- Pollock F. J., P. J. Morris, B. L. Willis, D. G. Bourne, 2011. The urgent need for robust coral disease diagnostics. *Plos Pathogens*, 7: e1002183.
- Radjasa O. K., J. Wiese, A. Sabdono, J. F. Imhoff, 2008. Corals as source of bacteria with antimicrobial activity. *Journal of Coastal Development*, 11: 121 - 130.
- Reshef L., O. Koren, Y. Loya, I. Zilber-Rosenberg, E. Rosenberg, 2006. The coral probiotic hypothesis. *Environmental Microbiology*, 8: 2068 - 2073.
- Ritchie K. B., G. W. Smith, 1998. Type II white-band disease. *Revista de Biología Tropical*, 46: 199 - 203.
- Rohwer F., V. Seguritan, F. Azam, N. Knowlton, 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 243: 1 - 10.
- Rosenberg E., C. A. Kellogg, F. Rohwer, 2007. A sea of microbes: coral microbiology. *Oceanography*, 20: 146 - 154.
- Rosenberg E., A. Kushmaro, E. Kramarsky-Winter, E. Banin, L. Yossi, 2009. The role of microorganisms in coral bleaching. *The ISME Journal*, 3: 139 - 146.
- Rypien K. L., J. R. Ward, F. Azam, 2010. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 12: 28 - 39.
- Shnit-Orland M., A. Sivan, A. Kushmaro, 2012. Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the coral holobiont. *Microbial Ecology*, 64: 851 - 859.
- Sutherland K. P., K. B. Ritchie, 2004. White pox disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. In: Rosenberg E., Loya Y. (eds). *Coral health and disease*. Springer, Berlin, 289 - 300.
- Toren A., L. Landau, A. Kushmaro, Y. Loya, E. Rosenberg, 1998. Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1379 - 1384.