

A study on bacteria associated with three hard coral species from Ninh Thuan waters by epifluorescence and most diluted culture method

Pham Thi Mien^{*}, Nguyen Kim Hanh, Nguyen Minh Hieu, Phan Minh Thu, Hoang Trung Du, Vo Hai Thi, Nguyen Trinh Duc Hieu, Le Tran Dung, Nguyen Huu Huan

Institute of Oceanography, VAST, Vietnam

*E-mail: mien.pham@gmail.com

Received: 11 February 2018; Accepted: 7 July 2018

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

Abstract

Coral associated bacteria and their host are currently one of the interested issues for research and scientists worldwide. The densities of zooxanthellae and bacteria associated with three most prevalent species *Acropora hyacinthus*, *Acropora muricata* and *Acropora robusta* in Hang Rai, Ninh Thuan was evaluated over time by staining with SYBR Gold and direct counting with epifluorescence method. The most dominant bacteria were isolated by culture dependent method. The densities of zooxanthellae and bacteria ranged from $0.39\text{--}1.83 \times 10^7$ cell/g, and $0.83\text{--}2.52 \times 10^8$ cell/g, respectively. Bacterial density in the 3 months was significantly different compared to the density of the bacteria in ambient water. Total heterotrophic bacteria, comma shaped bacteria and bacillus form showed negatively correlated with pH, PO_4 , while zooxanthellae showed no correlation with all factors.

Keywords: Symbiotic microbes, bacteria, *Acropora hyacinthus*, *Acropora muricata*, *Acropora robusta*, environmental parameters, Ninh Thuan.

Citation: Pham Thi Mien, Nguyen Kim Hanh, Nguyen Minh Hieu, Phan Minh Thu, Hoang Trung Du, Vo Hai Thi, Nguyen Trinh Duc Hieu, Le Tran Dung, Nguyen Huu Huan, 2019. A study on bacteria associated with three hard coral species from Ninh Thuan waters by epifluorescence and most diluted culture method. *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 19(2), 271–283.

Nghiên cứu vi sinh vật sống cùng một số loài san hô cứng tại Hang Rái, Ninh Thuận bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang kết hợp nuôi cấy tới hạn

Phạm Thị Miên*, Nguyễn Kim Hạnh, Nguyễn Minh Hiếu, Phan Minh Thụ, Hoàng Trung Du, Võ Hải Thi, Nguyễn Trịnh Đức Hiệu, Lê Trần Dũng, Nguyễn Hữu Huân

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*E-mail: mien.pham@gmail.com

Nhận bài: 11-2-2018; Chấp nhận đăng: 7-7-2018

Tóm tắt

Rạn san hô trên toàn thế giới đang đối mặt với sự huỷ diệt, một trong những nguyên nhân chính là do vi khuẩn gây bệnh và những tác động của môi trường. Nghiên cứu về hệ vi khuẩn sống cùng san hô và mối tương quan giữa vi khuẩn, san hô và các yếu tố môi trường là quan trọng và cấp thiết. Vi tảo *Symbiodinium* sp., vi khuẩn sống cùng 3 loài san hô cứng *Acropora hyacinthus*, *Acropora muricata* và *Acropora robusta* phổ biến tại Ninh Thuận được đánh giá vào các thời điểm trước, trong và sau khi san hô bị tẩy trắng bằng phương pháp đếm huỳnh quang và pha loãng tới hạn. Mật độ tảo *Symbiodinium* khác nhau có ý nghĩa thống kê (dao động $0,39-1,83 \times 10^7$ tb/g) ở các loài san hô khác nhau. Tuy nhiên, mật độ tảo cộng sinh không có khác biệt lớn giữa các tháng nghiên cứu. Mật độ vi khuẩn dao động từ $0,83-2,52 \times 10^8$ tb/g và có sự sai khác có ý nghĩa thống kê không chỉ giữa các loài san hô mà còn ở các thời điểm trước trong và sau tẩy trắng. Tổng vi khuẩn, phẩy khuẩn và trực khuẩn có tương quan nghịch và có ý nghĩa về mật độ thống kê với chỉ số pH và hàm lượng PO_4 . Ngược lại, mật độ tảo hoàn toàn không tương quan với các yếu tố môi trường.

Từ khóa: Vi tảo cộng sinh, vi khuẩn, *Acropora hyacinthus*, *Acropora muricata*, *Acropora robusta*, thông số môi trường, Ninh Thuận.

MỞ ĐẦU

Rạn san hô biển Việt Nam có tổng diện tích 110.000 ha với ít nhất 28 vùng rạn san hô phân bố ven bờ từ Bắc đến Nam và vùng ngoài khơi ở Hoàng Sa, Trường Sa [1]. Rạn san hô ở biển Nam Trung Bộ có thành phần loài đa dạng nhất với 351 loài được ghi nhận tại Nha Trang [2] Rạn san hô Việt Nam còn là nơi cư ngụ cho nhiều loài nguồn lợi có giá trị, có đến 70–90% các loài cá có vòng đời phụ thuộc rạn san hô ở một giai đoạn nào đó trong quá trình sinh sống, thực sự rạn san hô không chỉ mang lại lợi ích về sinh thái mà còn mang lại lợi ích kinh tế cho Việt Nam [3]. Hiện trạng chung trên toàn cầu

đang diễn ra đối với rạn san hô là chúng bị tác động bởi sự nóng lên của nhiệt độ nước biển và dẫn đến nguy cơ suy thoái, thậm chí có những dự đoán rạn san hô có thể thành rạn hải miên hoặc sinh vật khác-không phải san hô [4]. Cũng đã có nghiên cứu công bố, khi san hô bị ảnh hưởng bởi sự tẩy trắng, thì hải miên chiếm đóng và thay chỗ của san hô, như vậy làm tăng cường sự đe dọa đối với san hô [5]. Hiện tượng tẩy trắng san hô-một hiện tượng được biết đến phổ biến gây ra cái chết hàng loạt cho san hô trên toàn thế giới cũng đã quan sát thấy ở vùng biển Nam Châu Á Thái Bình Dương và Việt Nam vào năm 1998, có một số nơi được quan

sát thấy là xảy ra rất nghiêm trọng với hơn 30% san hô trong khu vực bị tẩy trắng. Hiện tượng tẩy trắng quan sát thấy ở vịnh Thái Lan, vịnh Nha Trang, vịnh Vân Phong và một số nơi khác vào năm 2010, nguyên nhân được cho là do ảnh hưởng của hiện tượng El Niño làm cho nhiệt độ nước biển tăng mặt tầng [6].

Hơn thế, có nhiều giả thuyết nêu ra rằng nhiệt độ tăng mặt nước biển tăng dẫn đến sự suy giảm số lượng hoặc tiêu diệt hoàn toàn tảo cộng sinh bắt buộc (*Symbiodinium*) của san hô, sự mất đi tảo cộng sinh có thể làm suy yếu miễn dịch ở san hô do thiếu dinh dưỡng, stress hoặc một số nguyên nhân khác [7]. Đồng thời, ở điều kiện thuận lợi như điều kiện tương thích về nhiệt độ, những vi khuẩn gây bệnh cơ hội đang sống cùng san hô có cơ hội bùng phát và tấn công san hô để cạnh tranh nơi ở, thức ăn,... Kết quả là san hô bị chết hàng loạt khi hệ thống miễn dịch không đủ mạnh để chống lại sự tấn công bởi các vi sinh vật gây bệnh cơ hội [8]. Vi sinh vật sống cùng có vai trò nhất định đối với vật chủ san hô, chúng là những nhà cung cấp chất dinh dưỡng cho san hô [9] tham gia vào cơ chế phòng vệ tự nhiên, chống lại các vi sinh vật gây bệnh qua việc sản sinh ra các chất có khả năng kháng vi sinh vật, ví dụ như peptides và thuốc kháng sinh [10, 11] và sự điều hòa cạnh tranh giữa các loài vi sinh vật trong cùng vật chủ [12]. Thành phần vi sinh vật trong san hô dẫn được chứng minh có liên quan mật thiết đến từng loài san hô riêng biệt, vai trò của chúng trong san hô cũng đang được làm rõ dần. *Roseobacter*, *Spongiobacter* (trực khuẩn Gram âm), *Vibrio* và *Alteromonas*-(phẩy khuẩn) là những vi khuẩn chủ yếu tham gia vào chu trình sinh địa hóa sulfur được tìm thấy ở san hô *Montipora aequituberculata* và san hô *A. millepora*. Chúng được chứng minh có liên quan đến việc sản sinh cũng như tiêu thụ sulfur từ nguồn vật chủ, khi thí nghiệm với dimethylsulfoniopropionate (DMSP) một chất hữu cơ giàu sulfur được tạo ra chủ yếu nhờ tảo cộng sinh với san hô [13, 14]. Bằng phương pháp sinh học phân tử không phụ thuộc nuôi cấy, *Vibrio* được phát hiện trong san hô *A. millepora* trước khi tẩy trắng, trong thời gian tẩy trắng *Vibrio* được xác định là nhóm chiếm ưu thế nhất với số lượng tăng cao và sau thời gian tẩy trắng thì số lượng có xu hướng giảm

dẫn đến ngang bằng với số lượng trước khi tẩy trắng. Bên cạnh đó nhóm vi khuẩn *Spongiobacter* sp. là trực khuẩn Gram âm, được coi là chiếm ưu thế nhất ở những mẫu san hô không bị tẩy trắng. Mặc dù *Vibrio* đã được biết đến là những vi khuẩn gây bệnh cho san hô, nhưng việc phát hiện ra chúng ở cả san hô khỏe mạnh, san hô đang bị tẩy trắng và sau khi bị tẩy trắng đã cho thấy có thể chúng chỉ là nhóm cơ hội đối ứng với trạng thái sức khỏe của san hô trước những tác động từ ngoài môi trường sống ví dụ nhiệt độ, pH. Hơn thế trong nghiên cứu của Bourne et al., [15], trong khi tảo cộng sinh có tương quan nghịch với nhiệt độ, tổng protein của coral holobiont (host và symbiont combined = san hô và những sinh vật sống cùng), được chỉ ra là không có tương quan với nhiệt độ nước biển tăng mặt tầng trong suốt thời gian dài nghiên cứu 2,5 năm.

Những nghiên cứu gần đây nhất của Garren et al., [16] về mối tương quan khi san hô bị căng thẳng bởi nhiệt thì chất nhầy sẽ tiết ra môi trường xung quanh chất DMSP với nồng độ cao hơn gấp 5 lần, ở nồng độ cao này chất DMSP có hóa ái lực (chemotaxis) thu hút vi khuẩn gây bệnh san hô *Vibrio* mặc dù DMSP là một chất hữu cơ giàu dinh dưỡng nguồn C và S nhưng vi khuẩn gây bệnh lại không đồng hóa DMSP trong thời gian thí nghiệm 24 giờ, điều này cho thấy để phản ứng với sự căng thẳng của môi trường san hô đã tiết ra chất hóa học có hóa ái lực đối với vi khuẩn gây bệnh, chất này như tín hiệu hóa học của san hô chuyển ra môi trường. Một nghiên cứu khác của nhóm tác giả Rainna [17] rất đáng chú ý khi công bố tìm thấy vi khuẩn *Pseudovibrio* sp. chủng P12 là một phẩy khuẩn thường được tìm thấy trong san hô tạo rạn, vi khuẩn này đồng hóa DMSP và sinh chất kháng sinh tropodithietic acid (TDA), phân tích cấu trúc cho thấy chất kháng sinh này có sulfur và có thể được hình thành từ việc đồng hóa DMSP của vi khuẩn, TDA có khả năng kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh cho san hô như *V. coralliilyticus*, *V. owensii* ở nồng độ rất thấp là 0,5 µg/ml.

Góp phần tìm hiểu vi sinh vật sống cùng san hô biển Việt Nam, nghiên cứu thực hiện với việc đánh giá mật độ của vi tảo cộng sinh, vi khuẩn dị dưỡng và vi khuẩn chiếm ưu thế khi nuôi cấy trong 3 loài san hô tạo rạn phổ

biển ở Hang Rái, Ninh Thuận ở các thời điểm khác nhau (mẫu thu tháng 5, 6/2016 thời gian có ghi nhận san hô tại khu vực thu mẫu đang bị tẩy trắng và mẫu thu tháng 8/2016 tương ứng với thời gian san hô sau tẩy trắng). Kết quả của nghiên cứu này sẽ giúp hiểu rõ hơn về hệ vi sinh vật và biến động về thành phần tương ứng vào các thời điểm và điều kiện môi trường khác nhau đặc biệt thời gian tháng 5,6 có ghi nhận san hô đang bị tẩy trắng và tháng 8 là thời điểm sau tẩy trắng.

PHƯƠNG PHÁP

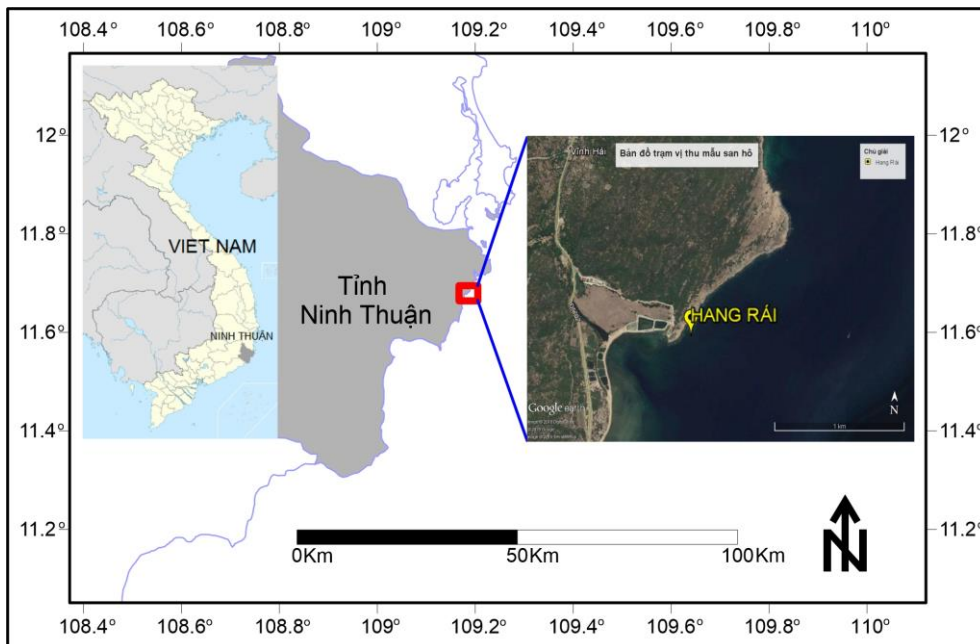
Địa điểm và thời gian thu mẫu, xử lý mẫu

Ba loài san hô được dùng để nghiên cứu trong đề tài này là *Acropora hyacinthus*, *Acropora muricata*, *Acropora robusta* được thu trong 3 lần khảo sát vào tháng 5, 6 và tháng 8 năm 2016 tại Hang Rái - Ninh Hải - Ninh Thuận. Mẫu san hô sống được thu nhờ thợ lặn có khí tài (SCUBA) ở độ sâu 5–7 m tại vị trí có tọa độ 109°18'28,1"E, 11°67'71,7"N, tại Hang Rái-Ninh Thuận (hình 1). San hô được thu vào túi nilông vô trùng, bảo quản trong tối, đặt trong bình đá lạnh và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong khoảng thời gian nhanh nhất có thể (ca. 2 giờ), và ngay sau đó được thực hiện các thí nghiệm. Các thông số môi trường như

hiệt độ (độ C), pH và độ mặn được đo bằng máy đa yếu tố cầm tay (HORIBA Model U10-Nhật Bản). Những thông số khác như DO, BOD₅, NH₄, NO₂, NO₃, TOM, Chl-a, PO₄ được phân tích theo phương pháp chuẩn về chất lượng môi trường nước biển [18].

Phương pháp nuôi cấy và phân tích mẫu

Mẫu san hô sau khi lấy về, cân 2 g mẫu đồng nhất trong 18 ml nước biển lọc vô trùng qua màng lọc 0,02 μm để được nồng độ 10⁻¹. Mẫu san hô dùng để đếm tổng số lượng vi khuẩn bằng phương pháp đếm trực tiếp dưới kính hiển vi huỳnh quang được cố định với formaldehyde đến nồng độ cuối cùng 3%, làm lạnh nhanh trong ni tơ lỏng và bảo quản ở -80°C cho đến khi phân tích. Xử lý mẫu san hô với dung dịch potassium citrate 1% nhằm loại những chất bắt màu huỳnh quang có sẵn trong san hô, sau đó lọc qua màng lọc 0,02 μm (Anodisc™ Whatman) và nhuộm với SYBR Gold (Invitrogen) [19] và soi dưới kính hiển vi quang học huỳnh quang. Tổng số vi khuẩn, hình dạng vi khuẩn (hình cầu, que, phẩy khuẩn,...) sẽ được đếm với kính hiển vi huỳnh quang Olympus Provis AX70, xử lý hình ảnh với phần mềm chụp ảnh kỹ thuật số (Olympus-DP71).



Hình 1. Bản đồ vị trí lấy mẫu

Đếm vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn: Vi khuẩn được cấy truyền liên tiếp đến nồng độ 10^{-8} vào môi trường Sea Water Broth (SWB-peptone 5 g/l, yeast extract 2,5 g/l, glucose 1 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/l, K_2HPO_4 0,1 g/l, NaCl 30 g/l). Quan sát sự tồn tại và phát triển của vi khuẩn sau 24, 48, 72 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ phòng $30^\circ C$ và so sánh với lô đối chứng chỉ có môi trường mà không cấy mẫu. Tính số lượng tổng vi sinh vật trong 2 g mẫu san hô từ 2 nồng độ pha loãng liên tiếp cao nhất có vi khuẩn theo phương pháp tới hạn $A(cfu/g) = N/(n_1Vf_1 + \dots + n_iVf_i)$. Trong đó: A : Khuẩn lạc vi khuẩn trong 1 g mẫu (cfu/g); N : Tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn; n_1, n_i : Số lượng đĩa cấy tại lần lượt ở nồng độ pha loãng thứ 1 và thứ i ; V : Thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào mỗi đĩa; f_i : Nồng độ pha loãng tương ứng.

Xác định, định danh vi khuẩn gây bệnh cơ hội chiếm ưu thế: Từ các mẫu san hô đã được đồng nhất trong nước biển lọc vô trùng, dùng 1 ml mẫu cấy lên môi trường Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) agar (HiMedia, Ấn Độ) nhằm phân lập *Vibrio*, và vi khuẩn gây bệnh cơ hội đường ruột nhóm *Enterobacteriaceae* trên môi trường MacConkey (HiMedia, Ấn Độ). Vi khuẩn gây bệnh cơ hội nhóm *Vibrio* và vi khuẩn *Enterobacteriaceae* được phân loại đến loài dựa vào phương pháp nuôi cấy truyền thống/hoặc dùng bộ KIT sinh hóa API20E (Biomérieux, Pháp).

Phương pháp xử lý số liệu

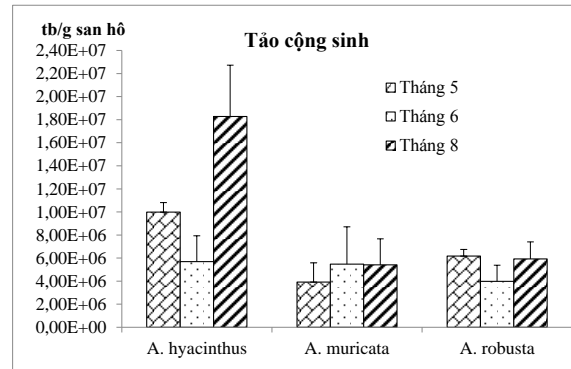
Toàn bộ số liệu được xử lý trên phần mềm thống kê R -R Development Core Team, [20], bản đồ trạm vị thu mẫu được xây dựng trên phần mềm Surfer và MapInfo.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tổng số vi tảo cộng sinh đếm trực tiếp dưới kính hiển vi quang học huỳnh quang

Số lượng tảo (tế bào/g san hô tươi) được trình bày trong hình 2 biểu diễn giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Hình 2 cho thấy tảo cộng sinh ở *A. hyacinthus* ở cả 3 tháng đều cao nhất so với hai loài san hô *A. muricata* và *A. robusta*. Số lượng tảo cộng sinh tìm thấy trong *A. hyacinthus* cũng dao động từ $5,69 \times 10^6$ tb/g đến $1,83 \times 10^7$ tb/g, trong khi tảo cộng sinh ở

san hô *A. muricata* dao động từ $3,92 \times 10^6$ tb/g đến $5,48 \times 10^6$ tb/g và *A. robusta* dao động từ trong khoảng $3,99-6,17 \times 10^6$ tb/g.



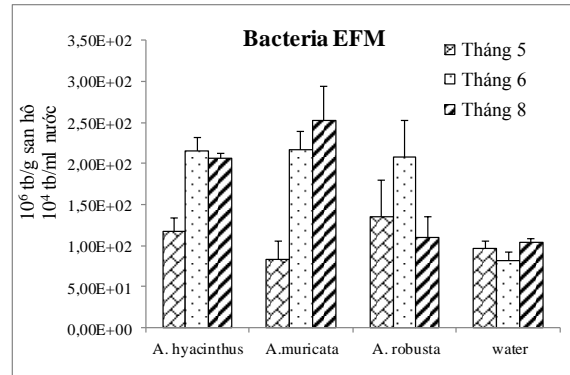
Hình 2. Tổng số tảo cộng sinh đếm với kính hiển vi quang học huỳnh quang

Sự sai khác về mật độ tảo cộng sinh trong ba loài san hô nghiên cứu có ý nghĩa về mặt thống kê, khi kiểm tra ANOVA một chiều cho thấy sự sai khác này phụ thuộc vào các loài tảo ($F_{\text{san hô}} = 6,81 > F_{0,05} = 3,42$ và $P_{\text{san hô}} = 0,0045 < 0,05$). Hơn thế khi kiểm tra hệ số di truyền ($0 \leq h^2 \leq 1$) xem thực sự có tác động đến sự sai khác tảo hay không, cho thấy hệ số di truyền tương đối cao với $h^2 = 0,8$ do đó càng khẳng định số lượng tảo thực sự phụ thuộc vào loài san hô. Trong đó số lượng tảo ở *A. robusta* ít biến động nhất, ngược lại số lượng tảo ở *A. hyacinthus* biến động lớn nhất. Nhìn chung số lượng tảo ở cả 3 loài san hô ở 3 tháng đều nằm trong giới hạn thông thường được tính trên 1 cm^2 bề mặt mô san hô sống là $1-5 \times 10^6$ tế bào. Tuy nhiên, số lượng tảo trong *A. hyacinthus* ở tháng 8 là $1,83 \times 10^7$ tb/g cao hơn mức thông thường khoảng 100 lần. Khi phân tích mối tương quan giữa số lượng tảo đối với vi khuẩn và các thông số môi trường (bảng 2) thì cho thấy mật độ tảo không có tương quan thuận cũng như tương quan nghịch đối với tất cả các yếu tố so sánh. Nghiên cứu vi sinh vật ở 34 tập đoàn *Acropora millepora* sống ở Great Barrier Reef (Australia) từ tháng 10 năm 2000 đến tháng 3 năm 2003 bao gồm cả thời gian san hô bị tẩy trắng đã chỉ ra rằng trong khi tẩy trắng mật độ tảo cộng sinh giảm đến 64% và có tương quan nghịch với nhiệt độ, ngược lại tỷ lệ phần trăm tảo cộng sinh bị thoái hóa (degenerate zoox-) có tương

quan thuận [15]. Một số nghiên cứu khác như nghiên cứu về tảo cộng sinh với ba loài san hô *Acropora hyacinthus*, *Acropora japonica* và *Cyphastrea chalcidicum* ở vịnh Tanabe, Nhật Bản tảo được đánh giá biến động số lượng qua thời gian dài trong năm, *Symbiodinium* clade C được cho là nhóm tảo ưu thế ở nhiệt độ thấp [21] trong khi *Symbiodinium* clade D là nhóm ưu thế được tìm thấy khi nâng nhiệt độ cao trong thí nghiệm với san hô *Porites* ở rặng san hô ở Palau [22]. Trong khi xảy ra hiện tượng tẩy trắng *Symbiodinium* C3 được phát hiện là loài chiếm ưu thế nhưng trải qua một thời gian chịu nhiệt và sau khi hiện tượng tẩy trắng xảy ra người ta phát hiện ra *Symbiodinium* D1a chiếm ưu thế [23]. Tuy nhiên một nghiên cứu khác chỉ ra nhiệt độ không làm ảnh hưởng đến tảo cộng sinh cũng như hệ vi sinh vật sống cùng san hô, đồng thời đề nghị rằng chính sự linh hoạt trong mối quan hệ sinh lý của san hô và hệ vi sinh vật sống cùng mới giúp san hô vượt qua ảnh hưởng bất lợi khi nhiệt độ môi trường tăng lên [24]. Nghiên cứu này chỉ tìm hiểu về số lượng tảo qua phương pháp nhuộm và đếm dưới kính hiển vi huỳnh quang do đó không thể chỉ ra các nhóm tảo cụ thể có mặt trong san hô. Không chỉ có *Symbiodinium* (dinoflagellate alga) có mối quan hệ tương hỗ cộng sinh đối với san hô cứng, khi *Chromera velia* được phân lập từ san hô *Plesiastrea versipora* ở cảng Sydney và san hô *Leptastrea purpurea* ở đảo One Tree Queensland, Australia [25] và gần đây, *Chromera velia* -động vật nguyên bào ký sinh thuộc ngành apicomplexan có cùng tổ tiên với tảo quang hợp *Symbiodinium* được phát hiện từ san hô *Montipora digitata* và được cho rằng động vật nguyên bào apicomplexan không quang hợp này nội cộng sinh với ấu trùng san hô *Acropora digitifera* và san hô *A. tenuis* [26]. Nghiên cứu này chỉ dùng phương pháp nhuộm và đếm dưới kính hiển vi huỳnh quang, do đó chỉ có thể đưa ra mật độ tảo trong san hô vào các thời điểm san hô đang tẩy trắng (tháng 5, 6) và sau tẩy trắng (tháng 8), mà không thể chỉ ra các nhóm tảo cụ thể có mặt trong san hô cũng như tỷ lệ tảo sống tảo chết. Do đó cần nhiều nghiên cứu chuyên sâu hơn nữa để đưa ra những nhận định về sự biến thiên của tảo cộng sinh và đối với san hô ở các trạng thái tẩy trắng và sau tẩy trắng.

Tổng số vi khuẩn đếm huỳnh quang và nuôi cấy pha loãng tới hạn

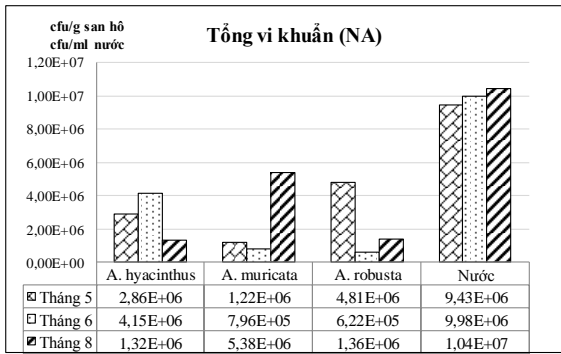
Tổng số vi khuẩn (tế bào/g san hô = tb/g, tế bào/ml nước = tb/ml) đếm trực tiếp qua kính hiển vi huỳnh quang epifluorescence microscope-EFM được trình bày trong hình 3 biểu diễn giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.



Hình 3. Tổng vi khuẩn dị dưỡng đếm huỳnh quang EFM

Tổng số vi khuẩn có mặt trong các mẫu san hô *A. hyacinthus* dao động $1,17-2,25 \times 10^8$ tb/g ở mẫu *A. muricata* là $0,83-2,52 \times 10^8$ tb/g và *A. robusta* là $1,10-2,08 \times 10^8$ tb/g. Trong nghiên cứu này tổng số vi khuẩn thấp nhất được tìm thấy ở *A. muricata* vào tháng 5 với $0,83 \pm 0,22 \times 10^8$ tb/g và cao nhất vào tháng 8 với $2,52 \pm 0,43 \times 10^8$ tb/g. Vi khuẩn trong nước biển dao động từ $0,82-1,04 \times 10^6$ tb/ml. Vi khuẩn có mặt trong san hô cao hơn rất nhiều (khoảng 200 lần) so với vi khuẩn trong nước biển khi đếm trực tiếp bằng phương pháp nhuộm và đếm huỳnh quang. Kết quả này tương đồng với những nghiên cứu tương tự của Nguyen et al., [27, 28].

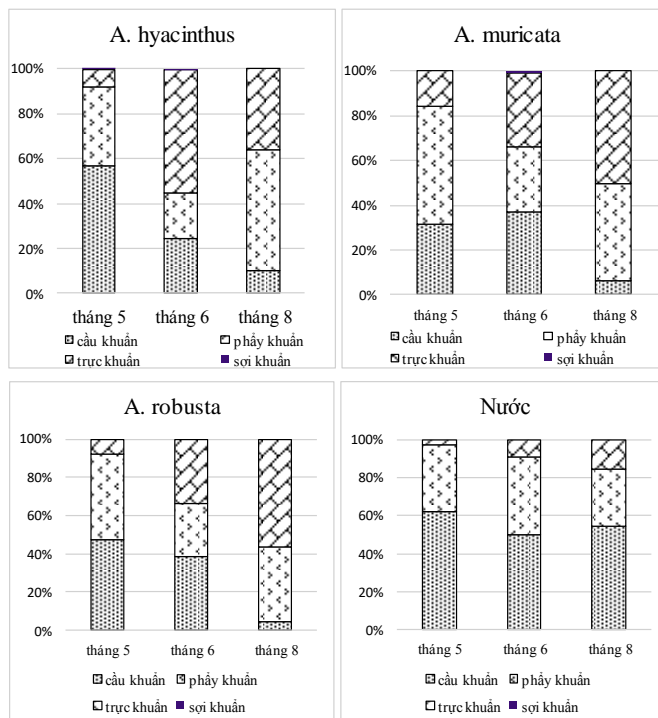
Tổng số vi khuẩn dị dưỡng qua nuôi cấy pha loãng tới hạn được trình bày trong hình 4, biểu diễn giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Hình 4 cho thấy cả 3 mẫu san hô đều có số lượng tổng vi khuẩn thấp hơn trong nước, vi khuẩn trong nước cao nhất vào tháng 8 với $1,04 \pm 0,0016 \times 10^7$ cfu/ml, tháng 5 và tháng 6 gần như tương đương với $9,43 \pm 0,64 \times 10^6$ cfu/ml và $9,98 \pm 2,15 \times 10^6$ cfu/ml. Tổng số vi khuẩn thấp nhất và cao nhất đều được tìm thấy trong san hô *A. muricata* tương ứng vào tháng 6 với $7,96 \pm 0,18 \times 10^5$ cfu/g và tháng 8 với $5,38 \pm 6,42 \times 10^6$ cfu/g.



Hình 4. Tổng vi khuẩn nuôi cấy trên NA

Trong nghiên cứu này vi khuẩn được đồng nhất trong nước biển lọc qua màng lọc 0,02 μm đã hạn chế tối đa vi khuẩn bên ngoài xâm nhiễm và cấy truyền trực tiếp vào môi trường dinh dưỡng không qua pha loãng với muối sinh lý nhằm khắc phục hạn chế của nuôi cấy truyền thống. Do đó có thể thấy số lượng vi sinh vật tổng số trong cả 3 loài san hô cứng cao hơn so với nghiên cứu phân lập vi sinh vật trong 4 loài san hô mềm tại vịnh Nha Trang [29]. Qua hình 4 cho thấy vi khuẩn trong nước cao hơn vi khuẩn trong san hô. Môi trường SWB và NA

có các thành phần dinh dưỡng thông thường nhằm phân lập vi sinh vật từ môi trường biển, do đó chúng có thể là môi trường thích hợp cho vi khuẩn có trong nước biển mà không phải là môi trường ưu thích của vi khuẩn trong san hô. Trong nghiên cứu đa dạng vi khuẩn sống cùng san hô *Alcyonium digitatum* ở biển Baltic, có rất ít vi khuẩn được phân lập từ môi trường nghèo dinh dưỡng BSA chỉ có agar và nước biển Baltic sau khi nuôi cấy 4 tuần ở 28°C, ngược lại cũng trên môi trường BSA nhưng ở 10°C thì có số lượng vi khuẩn nhiều hơn và đa dạng hơn [30]. Khi kiểm tra sự sai khác số lượng vi khuẩn trong san hô và trong nước có thực sự khác nhau hay không bằng phân tích ANOVA cho thấy sự khác biệt này là có ý nghĩa về mặt thống kê ($p = 0,0038$ và $F_{\text{san hô}} = 5,57 > F_{0,05} = 2,93$ và hệ số di truyền $h^2 = 0,82$). Tuy nhiên khi kiểm tra ANOVA hai yếu tố (san hô và thời gian: tháng 5, tháng 6, tháng 8) thì cho thấy yếu tố thời gian chi phối sự sai khác về số lượng vi khuẩn trong san hô. Trong đó $P_{\text{tháng}} = 0,01 < 0,05$ và $F_{\text{tháng}} = 17,58 > F_{0,05} = 6,94$ trong khi $P_{\text{san hô}} = 0,39 > 0,05$ và $F_{\text{san hô}} = 1,19 < F_{0,05} = 6,94$.



Hình 5. Thành phần vi khuẩn đếm trực tiếp EFM

Trong nghiên cứu này hình dạng tế bào vi khuẩn cũng được phân biệt qua đèn soi trực tiếp bằng kính hiển vi huỳnh quang và được thể hiện qua hình 5.

Số lượng vi khuẩn trong cả 3 loài san hô ở các mẫu thu tháng 5 đều thấp hơn ở các mẫu thu vào tháng 6 và tháng 8 (hình 4). Thành phần vi khuẩn ở *A. hyacinthus*, *A. robusta* và ở mẫu nước trong tháng 5 gần tương tự nhau, với thành phần chiếm đa số là cầu khuẩn, phẩy khuẩn và trực khuẩn ít nhất, ngược lại ở *A. muricata* thành phần phẩy khuẩn chiếm tỷ lệ cao nhất. Trực khuẩn được tìm thấy tăng dần vào các tháng 6 và tháng 8 ở mẫu nước, san hô *A. muricata* và *A. robusta*. So với mẫu nước, thành phần vi khuẩn trong 3 loài san hô có thay đổi theo thời gian khi ở mẫu nước cầu khuẩn luôn chiếm tỷ lệ cao nhất tiếp đến là phẩy khuẩn và trực khuẩn. Những vi khuẩn sản sinh và sử dụng nitơ được trực khuẩn Gram âm như nhóm *Roseobacter*, *Spongiobacter* và phẩy khuẩn Gram âm như *Vibrio* và *Alteromonas* tìm thấy trong mô của san hô có mối liên quan với vật chủ mà thực chất là mối liên quan rất mật thiết về dinh dưỡng [13, 14].

Bảng 1. So sánh tương quan theo Pearson's Product moment

So sánh	r (n = 27)	p
Vi khuẩn và PO ₄	-0,521	0,01
Vi khuẩn và pH	-0,573	0,01
Trực khuẩn và pH	-0,553	0,01
Trực khuẩn và PO ₄	-0,422	0,05
Trực khuẩn và độ mặn	0,562	0,01
Trực khuẩn và nhiệt độ	-0,453	0,05
Phẩy khuẩn và NO ₃	-0,462	0,05
Phẩy khuẩn và DO	-0,735	0,01
Phẩy khuẩn và Chl-a	-0,630	0,01
Phẩy khuẩn và BOD ₅	-0,545	0,01
Phẩy khuẩn và TOM	-0,543	0,01
Phẩy khuẩn và PO ₄	-0,516	0,01
Phẩy khuẩn và NH ₄	-0,497	0,01
Phẩy khuẩn và NO ₃	-0,462	0,05

Trong tháng 8 có pH thấp nhất so với các tháng còn lại. pH ở tháng 8 thấp và quan sát thấy trực khuẩn trong *A. muricata* và *A. robusta* tăng, trong khi phẩy khuẩn chiếm ưu thế trong *A. hyacinthus*. Kết quả kiểm định hệ

số tương quan Pearson cho thấy tổng vi khuẩn, trực khuẩn có tương quan nghịch với pH (bảng 1) do đó khi pH thấp thì tổng vi khuẩn cao và nhóm phẩy khuẩn, trực khuẩn chiếm ưu thế.

Nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Meron et al., [31, 32] trên san hô *Acropora eurystoma* ở vịnh Eilat, Biển Đỏ, trong đó chỉ ra rằng ở pH = 7,3 hệ vi khuẩn sống cùng san hô đa dạng hơn về thành phần cũng như số lượng so với hệ vi khuẩn sống cùng khi ở pH = 8,2 nhóm *Vibrionaceae* and *Alteromonadaceae* chiếm ưu thế nhất. Đặc biệt khi vi khuẩn có khả năng sinh kháng sinh đa số cũng được phân lập từ san hô ở pH = 7,3 trong số 54 chủng sinh kháng sinh thì có đến 50% chủng thuộc *Vibrionaceae* và 29% thuộc *Rhodobacteraceae*. Rõ ràng có thể thấy được khi san hô được nuôi ở điều kiện pH thấp thì hệ vi sinh vật liên quan đến bệnh tật và căng thẳng cho san hô tăng. Mặt khác vi khuẩn có tiềm năng kháng khuẩn cũng tăng khi san hô ở pH thấp. Trong tháng 8 hàm lượng PO₄ thấp nhất thì phẩy khuẩn và trực khuẩn đều tăng lần ắt cầu khuẩn. Kiểm tra mức độ tương quan cho thấy, vi khuẩn sống cùng san hô nhóm trực khuẩn và phẩy khuẩn có tương quan tỷ lệ nghịch có ý nghĩa về mặt thống kê (bảng 1) với hàm lượng PO₄, trong khi tỷ lệ cầu khuẩn, trực khuẩn phẩy khuẩn ở mẫu nước qua các tháng thay đổi không đáng kể và kiểm tra anova cho biết sự sai khác này cũng không có ý nghĩa (p > 0,05) thống kê.

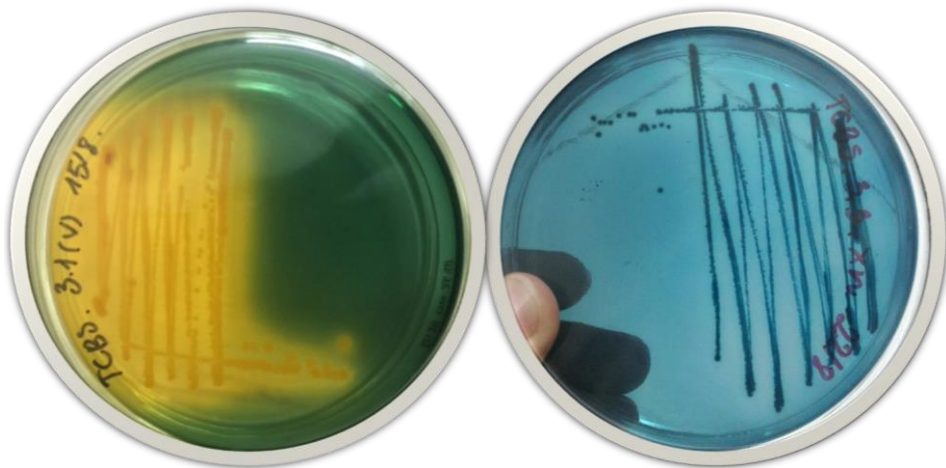
Định danh một số vi khuẩn chiếm ưu thế

Vi khuẩn cơ hội nhóm *Vibrio* hầu như không được tìm thấy ở các mẫu san hô vào tháng 5, tháng 6 có rất ít khuẩn lạc xuất hiện trên TCBS (ít hơn 10 khuẩn lạc cho cả 9 mẫu san hô/tháng). Số lượng phẩy khuẩn trên TCBS ở 3 loài san hô vào tháng 8 là 30 khuẩn lạc cho 9 mẫu san hô. Số lượng phẩy khuẩn có tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê với các thông số môi trường như DO, Chl-a, BOD₅, TOM, NH₄ và NO₃ (bảng 1) khi các thông số này vào tháng 5, 6 cao hơn vào tháng 8. Không có vi khuẩn nào từ các mẫu san hô thu tháng 5, tháng 6 được xác định là ưu thế cũng như định danh đến loài. Vì chúng xuất hiện trên TCBS nhưng không phát triển khi được nuôi cấy tiếp theo để làm thuần, do đó không thể phân lập và định danh đến loài. Có thể chúng cần chất dinh dưỡng đặc biệt nào đó, hoặc cần điều kiện nuôi

cây khác mà nghiên cứu không đáp ứng được. Sự thật là sự hiểu biết của chúng ta về vi sinh vật biển có thể chỉ là 0,01% về sinh thái, di truyền và đặc tính sinh học, trong khi vi sinh vật có thể nuôi cấy ước tính chỉ khoảng 0,1% trong số các loài được phát hiện [33]. Tuy nhiên cũng bằng nuôi cấy thông thường cho thấy nhóm phẩy khuẩn *Vibrio* sp. là vi khuẩn chiếm ưu thế trong cả chất nhầy và mô ở san hô *Acropora digitifera* vịnh Mannar [34], trong san hô cứng *Mussismilia hispida* ở biển Brazil [35] và san hô cứng *Acropora hyacinthus*, *Stylophora pistillata* ở Great Barrier Reef [10]. Gần đây có nhiều phát hiện cho thấy kể cả những vi khuẩn thường được cho rằng liên quan đến gây bệnh như *Vibrio*, *Shewanella*...

nhưng khi chúng được khai thác từ động vật không xương sống ví dụ *Shewanella algae* trực khuẩn Gram âm phân lập từ hải miên *Callyspongia diffusa* biển Ấn Độ là chủng thể hiện kháng lại nhiều vi khuẩn đồng thời có khả năng kháng cả nấm gây bệnh [36].

Nghiên cứu này đã xác định đến loài được hai chủng vi khuẩn gây bệnh cơ hội đó là chủng TCBS 3.1 (v) được xác định là *Enterobacter amnigenus* 1 và chủng TCBS 3.3 được xác định là *Pseudomonas aeruginosa*. Hai chủng này đều được tìm thấy là vi khuẩn chiếm ưu thế từ san hô *A. muricata*. Hình dạng khuẩn lạc và kết quả định danh bằng KIT API20E cho hai chủng này được trình bày trong hình 6–7.



Hình 6. Khuẩn lạc chủng TCBS 3.1 (v) và TCBS 3.3



Hình 7. Kết quả KIT API 20E cho TCBS 3.1 (v) và TCBS 3.3

Cả hai vi khuẩn *E. amnigenus* 1 và *P. aeruginosa* chiếm ưu thế đều là những trực khuẩn Gram âm. So sánh tương quan giữa trực khuẩn và các thông số môi trường cho thấy trực khuẩn có tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê với nhiệt độ, pH và PO_4 (bảng 1). Vào tháng 8, thông số pH và PO_4 thấp hơn tháng 5 và tháng 6, khi đó trực khuẩn chiếm tỷ lệ cao nhất trong thành phần của vi khuẩn sống cùng san hô. Đặc biệt hai chủng chiếm ưu thế và được định danh đến loài có tương quan với các thông số môi trường pH và PO_4 . Khả năng sử dụng phốt pho (P-phosphorus) vô cơ ở vi khuẩn có tương quan mật thiết với pH môi trường, khi vi khuẩn phải tiết ra các axit hữu cơ nhằm giảm pH để hòa tan các khoáng chất có chứa phốt pho và các dạng phốt pho ở dạng ion như là PO_4 (phosphate) và giải phóng phốt pho ra ngoài. Vi khuẩn có khả năng sử dụng P vô cơ được sử dụng làm phân bón sinh học từ năm 1950. Một trong số vi khuẩn có khả năng hòa tan P vô cơ hiệu quả phải kể đến là những chủng thuộc chi *Enterobacter* và *Pseudomonas* [37]. Trong một số trường hợp chính sự thiếu hụt phosphate (PO_4) thúc đẩy quá trình hòa tan phosphate [38].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Mật độ tảo cộng sinh với san hô ở cả ba loài san hô có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê và phụ thuộc vào loài san hô, mặt khác sự khác biệt về mật độ tảo trong các tháng cũng có ý nghĩa về mặt thống kê.

Vi khuẩn trong san hô qua nhuộm đếm trực tiếp dưới kính hiển vi huỳnh quang và vi khuẩn có thể nuôi cấy được trên NA có sự chênh lệch rất lớn đến 200 lần. *Vibrio* không phải là vi sinh vật gây bệnh cơ hội chiếm ưu thế, ngược lại, trực khuẩn Gram âm *E. amnigenus* 1 và *P. aeruginosa* tình cờ được xác định là vi khuẩn chiếm ưu thế và có mối tương quan mật thiết đến thông số PO_4 (phosphate) cũng như pH là những kết quả bất ngờ nhưng rất đáng chú ý của nghiên cứu này.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu này chỉ dừng lại ở mức độ đếm tổng số tảo cộng sinh và không đưa ra được thành phần loài cụ thể có mặt trong các mẫu san hô. Để hiểu rõ hơn về các clade của tảo

cộng sinh *Symbiodinium* hay thậm chí là các vi tảo khác (*Chromera* sp.) cộng sinh với san hô, thì cần có những nghiên cứu chuyên sâu như áp dụng các phương pháp xác định gen.

Sử dụng thuốc nhuộm DNA và loại bỏ được chất bắt màu huỳnh quang sẵn có trong mô san hô để nhuộm và đếm vi khuẩn trong san hô lần đầu tiên được thực hiện trên 3 loài san hô tạo rạn là kết quả nổi bật của nghiên cứu này. Với sự chênh lệch giữa vi khuẩn có mặt thực sự và vi khuẩn có thể nuôi cấy theo phương pháp truyền thống cho vi khuẩn trong san hô thực sự cần những chất dinh dưỡng hoặc điều kiện nuôi cấy đặc biệt và điều này sẽ giúp ích cho những nghiên cứu đa dạng vi sinh vật sống cùng san hô phụ thuộc nuôi cấy trong tương lai. Mặt khác, nhóm phẩy khuẩn (hình dạng điển hình của *Vibrio*) đã từng được xác định là những vi khuẩn gây bệnh cơ hội cho san hô, có mối tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê với một số thông số môi trường, cũng mở ra một cách nhìn mới về vi khuẩn sống cùng san hô và đồng thời gợi ra những hướng nghiên cứu mới cho tương lai.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện bằng nguồn kinh phí cấp cho đề tài cơ sở năm 2016 của phòng Sinh thái biển, Viện hải dương học. Chúng tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành Ban Lãnh đạo Viện Hải dương học, đã đưa ra ý tưởng tìm hiểu về tác động của ENSO cũng như giúp đỡ về tài chính để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này. Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến anh Phan Kim Hoàng cùng một số cán bộ thuộc phòng Nguồn lợi thủy sinh, Viện Hải dương học đã thực hiện thu mẫu và phân loại san hô cứng trong các chuyến thực địa thuộc đề tài ĐTDL.CN-28/17..

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Vo, S. T., Pernetta, J. C., and Paterson, C. J., 2013. Status and trends in coastal habitats of the South China Sea. *Ocean & Coastal Management*, 85, 153–163.
- [2] Võ Sĩ Tuấn, Lyndon DeVantier, Nguyễn Văn Long, Hứa Thái Tuyên, Nguyễn Xuân Hòa, và Phan Kim Hoàng, 2002. Nghiên cứu thành phần loài, cấu trúc quần xã và hiện trạng rạn san hô nhằm đề xuất giải pháp quản lý đa dạng sinh học ở khu

- bảo tồn biển Hòn Mun, vịnh Nha Trang. *Hội nghị khoa học “Biển Đông-2002”*. Nxb. Nông nghiệp. Tr. 649–690.
- [3] Tuan, V. S., 2002. Report on status of coral reefs in Vietnam: 2000. In *Proceedings of the Ninth International Coral Reef Symposium, Bali, 23–27 October 2000*, (Vol. 2, pp. 891–899).
- [4] Bell, J. J., Davy, S. K., Jones, T., Taylor, M. W., and Webster, N. S., 2013. Could some coral reefs become sponge reefs as our climate changes?. *Global Change Biology*, 19(9), 2613–2624.
- [5] Carballo, J. L., Bautista, E., Nava, H., Cruz-Barraza, J. A., and Chávez, J. A., 2013. Boring sponges, an increasing threat for coral reefs affected by bleaching events. *Ecology and Evolution*, 3(4), 872–886.
- [6] Tun, K., Chou, L. M., Low, J., Yeemin, T., Phongsuwan, N., Setiasih, N., Wilson, J., Amri, A. Y., Adzis, K. A. A., Lane, D., Bochove, J-W. V., Kluskens, B., Nguyen, V. L., Vo, S. T., and Gomez, E., 2010. Regional overview on the 2010 coral bleaching event in Southeast Asia. In: *Status of Coral Reefs in East Asian Seas Regions: 2010*. Ministry of the Environment of Japan, 9–27.
- [7] Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A., and Jara, J., 1997. Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*, 388(6639), 265–269.
- [8] Rosenberg, E., Kushmaro, A., Kramarsky-Winter, E., Banin, E., and Yossi, L., 2009. The role of microorganisms in coral bleaching. *The ISME Journal*, 3(2), 139–146.
- [9] Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., and Zilber-Rosenberg, I., 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 355–362.
- [10] Kvennefors, E. C. E., Sampayo, E., Kerr, C., Vieira, G., Roff, G., and Barnes, A. C., 2012. Regulation of bacterial communities through antimicrobial activity by the coral holobiont. *Microbial Ecology*, 63(3), 605–618.
- [11] Shnit-Orland, M., Sivan, A., and Kushmaro, A., 2012. Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the coral holobiont. *Microbial Ecology*, 64(4), 851–859.
- [12] Ritchie, K. B., 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 322, 1–14.
- [13] Raina, J. B., Dinsdale, E. A., Willis, B. L., and Bourne, D. G., 2010. Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations?. *Trends in Microbiology*, 18(3), 101–108.
- [14] Raina, J. B., Tapiolas, D., Willis, B. L., and Bourne, D. G., 2009. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3492–3501.
- [15] Bourne, D., Iida, Y., Uthicke, S., and Smith-Keune, C., 2008. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *The ISME Journal*, 2(4), 350–363.
- [16] Garren, M., Son, K., Raina, J. B., Rusconi, R., Menolascina, F., Shapiro, O. H., Tout, J., Bourne, D. G., Seymour, J. R., and Stocker, R. (2014). A bacterial pathogen uses dimethylsulfoniopropionate as a cue to target heat-stressed corals. *The ISME journal*, 8(5), 999–1007.
- [17] Raina, J. B., Tapiolas, D., Motti, C. A., Foret, S., Seemann, T., Tebben, J., Willis, B. L., and Bourne, D. G., 2016. Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals. *PeerJ*, 4, e2275.
- [18] Baird, R. B., Eaton, A. D., and Clesceri, L. S., 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater (Vol. 10). E. W. Rice (Ed.). Washington, DC: American Public Health Association.
- [19] Leruste, A., Bouvier, T., and Bettarel, Y., 2012. Enumerating viruses in coral mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6377–6379.
- [20] Team, R. C., 2013. R: A language and environment for statistical computing.

- [21] Lien, Y. T., Fukami, H., and Yamashita, Y., 2012. Symbiodinium clade C dominates zooxanthellate corals (Scleractinia) in the temperate region of Japan. *Zoological Science*, 29(3), 173–181.
- [22] Fabricius, K. E., Mieog, J. C., Colin, P. L., Idip, D., and van Oppen, M. J., 2004. Identity and diversity of coral endosymbionts (zooxanthellae) from three Palauan reefs with contrasting bleaching, temperature and shading histories. *Molecular Ecology*, 13(8), 2445–2458.
- [23] Silverstein, R. N., Cunning, R., and Baker, A. C., 2015. Change in algal symbiont communities after bleaching, not prior heat exposure, increases heat tolerance of reef corals. *Global change biology*, 21(1), 236–249.
- [24] Bellantuono, A. J., Hoegh-Guldberg, O., and Rodriguez-Lanetty, M., 2011. Resistance to thermal stress in corals without changes in symbiont composition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1731), 1100–1107.
- [25] Moore, R. B., Oborník, M., Janoušková, J., Chrudimský, T., Vancová, M., Green, D. H., Wright, S. W., Davies, N. W., Bolch, C. J. S., Heimann, K., Šlapeta, J., Hoegh-Guldberg, O., Logsdon, J. M., and Carter, D. A., 2008. A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature*, 451(7181), 959–963.
- [26] Cumbo, V. R., Baird, A. H., Moore, R. B., Negri, A. P., Neilan, B. A., Salih, A., van Oppen, J. H., Wang, Y., and Marquis, C. P., 2013. *Chromera velia* is endosymbiotic in larvae of the reef corals *Acropora digitifera* and *A. tenuis*. *Protist*, 164(2), 237–244.
- [27] Hanh, N. K., Bettarel, Y., Bouvier, T., Bouvier, C., Hai, D. N., Lam, N. N., Thuy, N. T., Huy, T. Q., and Brune, J., 2015. Coral mucus is a hot spot for viral infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 5773–5783.
- [28] Nguyen-Kim, H., Bouvier, T., Bouvier, C., Doan-Nhu, H., Nguyen-Ngoc, L., Rochelle-Newall, E., Baudoux, A. C., Desnues, C., Reynaud, S., Ferrier-Pages, C., and Bettarel, Y., 2014. High occurrence of viruses in the mucus layer of scleractinian corals. *Environmental Microbiology Reports*, 6(6), 675–682.
- [29] Phạm Thị Miên, Võ Hải Thi, Lê Hoài Hương và Hoàng Xuân Bền, 2010. Phân lập vi khuẩn từ san hô mềm *Sinularia* spp. và thử nghiệm hoạt tính kháng Tetracycline, Gentamicin, Cefazolin của chúng. *Tuyển tập nghiên cứu biển*, 17, 183–195.
- [30] Pham, T. M., Wiese, J., Wenzel-Storjohann, A., and Imhoff, J. F., 2016. Diversity and antimicrobial potential of bacterial isolates associated with the soft coral *Alcyonium digitatum* from the Baltic Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(1), 105–119.
- [31] Meron, D., Atias, E., Kruh, L. I., Elifantz, H., Minz, D., Fine, M., and Banin, E., 2011. The impact of reduced pH on the microbial community of the coral *Acropora eurystoma*. *The ISME Journal*, 5(1), 51–60.
- [32] Meron, D., Rodolfo-Metalpa, R., Cunning, R., Baker, A. C., Fine, M., and Banin, E., 2012. Changes in coral microbial communities in response to a natural pH gradient. *The ISME Journal*, 6(9), 1775–1785.
- [33] Simon, C., and Daniel, R., 2011. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153–1161.
- [34] Nithyanand, P., and Pandian, S. K., 2009. Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(3), 384–394.
- [35] de Castro, A. P., Araújo, S. D., Reis, A. M., Moura, R. L., Francini-Filho, R. B., Pappas, G., Rodrigues, T. B., Thompson, F. L., and Krüger, R. H., 2010. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. *Microbial Ecology*, 59(4), 658–667.

- [36] Rachanamol, R. S., Lipton, A. P., Thankamani, V., Sarika, A. R., and Selvin, J., 2014. Molecular characterization and bioactivity profile of the tropical sponge-associated bacterium *Shewanella algae* VCDB. *Helgoland marine research*, 68(2), 263–269.
- [37] Yazdani, M., Bahmanyar, M. A., Pirdashti, H., & Esmaili, M. A. (2009). Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.). *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 49, 90–92.
- [38] Gyaneshwar, P., Parekh, L. J., Archana, G., Poole, P. S., Collins, M. D., Hutson, R. A., and Kumar, G. N., 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS microbiology letters*, 171(2), 223–229.