

ẢNH HƯỞNG CỦA SỰ TĂNG NHIỆT ĐỘ ĐỐI VỚI MẬT ĐỘ ZOOXANTHELLAE, HÀM LƯỢNG LIPIT TỔNG, CÁC LỚP CHẤT LIPIT, MALONDIANDEHIT VÀ CHLOROPHYLL CỦA MỘT SỐ LOÀI SAN HÔ CHỨA TẢO CỘNG SINH CỦA VIỆT NAM

Nguyễn Văn Sơn^{1*}, Phạm Quốc Long¹, Phạm Minh Quân¹,
Hà Việt Hải¹, Trần Thu Thủy¹, Imbs A.B²

¹*Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

*E-mail: son.nguyen.pt@gmail.com

²*Viện Sinh vật biển A.V Zhirmunsky, Phân viện Viễn đông, Viện Hàn lâm Khoa học Liên bang Nga*

Ngày nhận bài: 8-6-2013

TÓM TẮT: Trong các loài san hô chứa tảo cộng sinh zooxanthellae quan sát thấy có sự liên hệ cộng sinh chặt chẽ giữa vật chủ san hô và vi sinh vật cộng sinh với chúng. Zooxanthellae có thể cung cấp tới 90% năng lượng cho vật chủ; đổi lại chúng nhận được chất dinh dưỡng và sự bảo vệ. Trong các thời kỳ tăng nhiệt độ, san hô mất đi zooxanthellae cộng sinh và chết. Hiện tượng này được gọi là hiện tượng tẩy trắng san hô. Hiện tượng tẩy trắng san hô có liên quan mật thiết đến những thay đổi trong thành phần sinh hóa của san hô khi chúng bị tẩy trắng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định mật độ của zooxanthellae, những sự thay đổi về hàm lượng lipit tổng, các lớp chất lipit, và axit béo xảy ra trong quá trình san hô bị tẩy trắng nhân tạo. Các kết quả chỉ ra rằng, mật độ tảo zooxanthellae giảm liên tục trong quá trình tẩy trắng san hô. Đồng thời san hô cũng mất đi hơn một nửa lượng lipit tổng. Không quan sát thấy sự thay đổi về hàm lượng tương đối giữa lipit cấu trúc và lipit dự trữ của san hô, tuy nhiên có những thay đổi đáng kể về thành phần và hàm lượng các axit béo. Trong các san hô bị tẩy trắng thì hàm lượng PUFA giảm đáng kể, ngược lại hàm lượng MUFA và SAFA tăng lên.

Từ khóa: San hô, zooxanthellae, axit béo, sinh vật cộng sinh, tẩy trắng

MỞ ĐẦU

Nhiều loài san hô nhiệt đới chứa vi tảo nội cộng sinh zooxanthellae. Các tảo cộng sinh này có thể cung cấp tới 90% năng lượng cho sinh vật chủ dưới dạng cacbon hữu cơ [1, 2]. Các chất tảo cộng sinh vận chuyển sang cơ thể vật chủ bao gồm amino axit, đường, chất béo và glycerol [3]. Quá trình tăng lên nhiệt độ nước biển cộng với các yếu tố bất lợi khác làm mất đi các zooxanthellae cộng sinh trong san hô [1-5]. Quá trình này gọi là quá trình tẩy trắng san

hô, trong vòng vài thập kỉ trở lại đây ước tính có tới 30% san hô trên phạm vi toàn thế giới bị chết do hiện tượng san hô bị tẩy trắng [5]. Chỉ tính riêng trong năm 1998 đã có tới 16% san hô bị tẩy trắng trên tất cả các đại dương thế giới do kết quả của hiện tượng El nino [6].

Trên thế giới có nhiều nhóm nghiên cứu về quá trình tẩy trắng san hô cũng như ảnh hưởng của nó đối với các hệ sinh thái biển [7, 8, 9]. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu sâu về sự thay đổi hàm

lượng lipid và các hoạt chất lipid xảy ra trong quá trình san hô bị tẩy trắng cũng như vai trò của lipid trong quá trình này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát sự biến động của lipid tổng, các lớp chất lipid, malondiandehit, và chlorophyll xảy ra trong quá trình san hô bị tẩy trắng. Đồng thời mật độ của tảo cộng sinh zooxanthellae cũng được khảo sát trong suốt thời gian của thí nghiệm.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Các mẫu san hô thuộc hai loài san hô cứng *Montipora digitata* (Dana 1846) (hình 1a) và *Acropora intermedia* (Brook 1891) (hình 1b), và một loài san hô mềm *Sinularia capitalis* (Pratt 1903) (hình 1c) được thu thập tại vùng biển thuộc vịnh Nha Trang.



Hình 1. Ảnh mẫu tiêu bản của 3 loài san hô thí nghiệm
a- *Montipora digitata*; b- *Acropora intermedia*; c- *Acropora intermedia*

Tất cả các mẫu được tiến hành định danh tên khoa học bởi các chuyên gia sinh học của Phân viện Viễn đông, Viện Hàn lâm Khoa học Liên bang Nga. Mẫu được lưu giữ tiêu bản và bảo quản ở các điều kiện tiêu chuẩn. Mẫu san hô sử dụng cho nghiên cứu được nuôi trong nước biển với điều kiện ánh sáng và nhiệt độ thích hợp, và được sử dụng không quá 3 ngày kể từ khi lấy mẫu.

Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng 4 tập đoàn san hô đối với mỗi loài san hô nghiên cứu, trong đó mỗi tập đoàn sử dụng các mẫu san hô có chiều dài 4 - 6cm. Các mẫu san hô được nuôi với nước biển lọc ở nhiệt độ $25 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 3 ngày để chúng phát triển ổn định sau thời gian xử lý mẫu. Các mẫu san hô nay sau đó được chuyển sang 6 bể thí nghiệm, mỗi loài 2 bể, 1 bể thí nghiệm và 1 bể đối chứng. Bể đối chứng được giữ ở nhiệt độ 25°C trong suốt thời gian thí nghiệm, trong khi đó bể thí nghiệm cứ 4 giờ lại tăng lên 1°C cho đến khi đạt nhiệt độ 33°C , và giữ ở nhiệt độ này cho đến khi đủ 48 giờ thí nghiệm tổng số. Khoảng thời gian 4 giờ là đủ để quan sát những thay đổi về hình thái học cũng như các thành phần sinh hóa trong san hô.

Các bể thí nghiệm được đặt trong phòng thoáng khí, có cửa kính và đèn chiếu sáng đảm bảo đủ ánh sáng cho tảo cộng sinh quang hợp. Bể được sục khí liên tục trong suốt thời gian thí nghiệm. Nhiệt độ

của bể thí nghiệm được nâng từ từ bằng thiết bị làm ấm nước và được đo bằng thiết bị đo nhiệt tự động. Các thông số khác của nước biển bao gồm độ muối, pH, độ trong, cường độ ánh sáng ... được giữ như nhau với tất cả 6 bể trong suốt thời gian thí nghiệm.

Lipid tổng có trong các mẫu san hô thí nghiệm được tách chiết theo phương pháp của E. G Bligh và W. J Dyer [10]. Các lớp chất lipid được phân tách bằng phương pháp sắc ký bản mỏng Merck Kieselgel 60G ($10 \times 10\text{cm}$) với các hệ dung môi được triển khai n-Hexan/ Et_2O / CH_3COOH (70:30:1, v/v) và $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Benzen}$ (65:30:10, v/v). Các bản mỏng sau sắc ký được xử lý và quét bằng máy quét ảnh Epson Perfection 2400 Photo (Nhật Bản) với chế độ quét thang màu xám. Hàm lượng các lớp chất lipid được đánh giá dựa theo độ đậm của vết ảnh, sử dụng chương trình phân tích hình ảnh Sorbfil Densitometer (LB Nga).

Mật độ zooxanthellae được xác định theo phương pháp của Yakovleva và Hidaka [11]. Trong đó, dịch đồng nhất mô của các mẫu san hô được li tâm, phần dịch được loại bỏ và phần cặn được sử dụng để đếm số tế bào vi tảo zooxanthellae. Mật độ của zooxanthellae được biểu hiện thông qua số lượng tế bào trên 1 đơn vị diện tích. Hàm lượng malondiandehit được xác định sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC và hàm lượng chlorophyll được xác định dựa theo phương pháp xác định chlorophyll huỳnh quang.

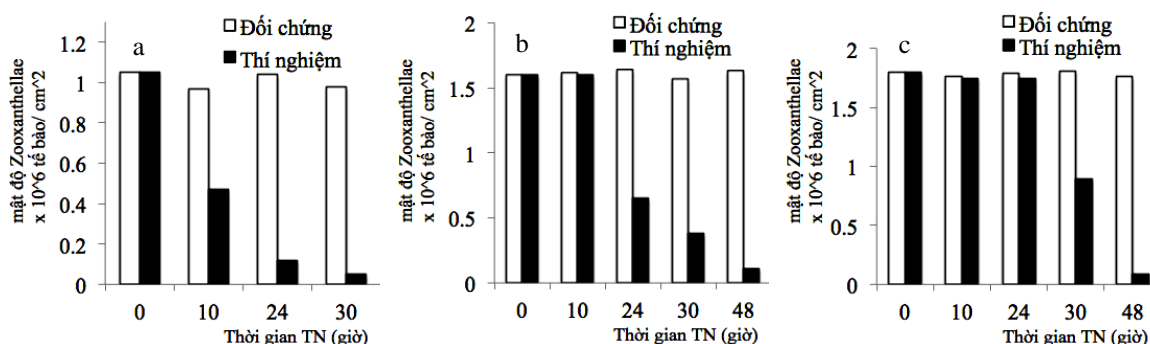
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mật độ zooxanthellae trong thời gian thí nghiệm

Mật độ tảo cộng sinh zooxanthellae nghiên cứu phụ thuộc vào nhiệt độ cũng như thời gian thí nghiệm. Trong các thí nghiệm đối chứng (25 °C), không có sự thay đổi đáng kể mật độ của zooxanthellae trên cả 3 loài san hô nghiên cứu trong suốt thời gian thí nghiệm (hình 2). Trong khi đó các lô thí nghiệm quan sát thấy những thay đổi đáng kể mật độ zooxanthellae. Ba loài san hô *A. intermedia*, *S. capitalis*, và *M. digitata* giảm còn 50 % mật độ tảo cộng sinh sau các thời gian thí nghiệm tương ứng là 10, 24 và 30 giờ (hình 2a,b,c). Mật độ zooxanthellae trong *A. intermedia* giảm 95 % sau 30

giờ thí nghiệm (hình 2a) trong khi đó *S. capitalis* và *M. digitata* phải mất đến 48 giờ thí nghiệm để giảm mật độ zooxanthellae tương tự (hình 2b,c).

Các quan sát về hình thái học cũng chỉ ra rằng, trong thời gian thí nghiệm thì *A. intermedia* bị tẩy trắng trước 2 loài san hô còn lại. *M. digitata* là loài san hô xuất hiện các biểu hiện của sự tẩy trắng lâu nhất. Điều này khẳng định rằng có sự tương quan giữa khả năng chống chịu lại những yếu tố bất lợi về nhiệt độ với khả năng bảo vệ tảo cộng sinh zooxanthellae của san hô. Những loài san hô có cơ chế bảo vệ zooxanthellae tốt có khả năng giữ gìn tảo cộng sinh tốt hơn và vì thế chống chịu được với các biến động xấu của môi trường tốt hơn.

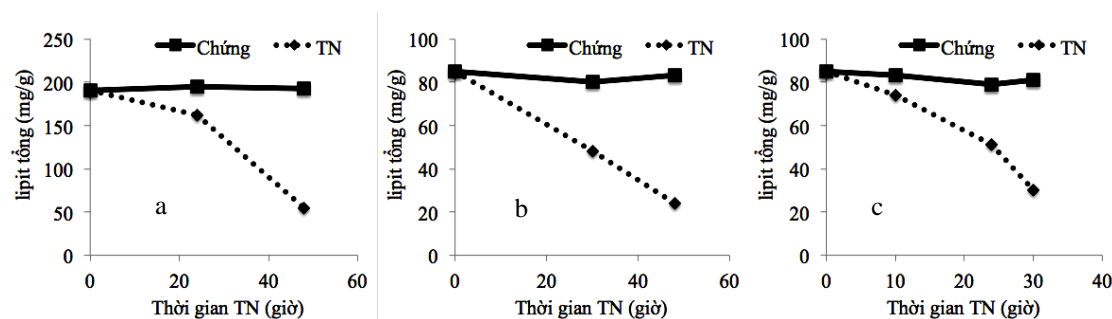


Hình 2. Mật độ tảo cộng sinh zooxanthellae (10⁶ tb/cm²) ở a- *A. intermedia*, b- *S. capitalis*, c- *M. digitata* theo thời gian thí nghiệm (TN)
Cột màu trắng: lô đối chứng, cột màu đen: lô thí nghiệm

Hàm lượng lipid tổng và thành phần các lớp chất lipid

Không có sự biến đổi đáng kể về hàm lượng lipid tổng trong tất cả các mẫu san hô của cả 3 loài ở lô đối chứng (hình 3a-c). Ngược lại, quan sát thấy ảnh hưởng rõ ràng của sự tăng nhiệt độ đối

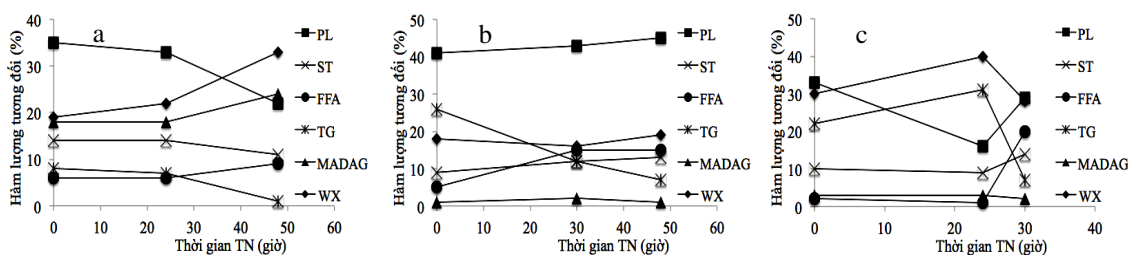
với lô thí nghiệm. Sau 24 giờ thí nghiệm, *S. capitalis* và *A. intermedia* mất đi 17 và 35% lượng lipid tổng tương ứng (hình 3a, 3c); *M. digitata* mất đi tới 40% lượng lipid tổng sau 30 giờ thí nghiệm (hình 3b). Sau khi kết thúc thí nghiệm, các mẫu thuộc lô thí nghiệm mất đi tới 60 - 75% lượng lipid tổng so với mẫu đối chứng.



Hình 3. Sự biến đổi hàm lượng lipid tổng của các loài san hô nghiên cứu trong thời gian thí nghiệm (TN)
a- *S. capitalis*; b- *M. digitata*; c- *A. intermedia*

Hàm lượng tương đối của các lớp chất lipid cũng biến đổi phụ thuộc vào sự tăng nhiệt độ và thời gian thí nghiệm. Hàm lượng tương đối của các axit béo tự do không biến đổi giữa lô thí nghiệm và lô đối chứng đối với loài *S. capitalis* và *M. digitata* trong suốt thời gian thí nghiệm, tuy nhiên hàm lượng này tăng lên 2 lần tại 24 giờ và 3 lần tại 30 giờ thí nghiệm đối với trường hợp của *M. digitata* (hình 4b). Các số liệu chỉ ra rằng không sự thay đổi về hàm lượng tương đối của lipid cấu trúc (lipid phân cực và steroid) và lipid dự trữ (sáp và triacylglycerol) đối với lô đối chứng trong suốt thời gian thí nghiệm của cả 3 loài san hô nghiên cứu. Kết quả tương tự được quan sát đối với lô thí nghiệm của *S. capitalis* (hình 4a) và *M. digitata* (hình 4b) trong vòng 24 giờ và 30 giờ thí nghiệm tương ứng, ngoại trừ trường hợp với triacylglycerol trong *M.*

digitata, nồng độ này giảm 67% so với lô đối chứng. Đối với trường hợp của *A. intermedia*, hàm lượng tương đối của lipid phân cực giảm 2 lần sau 24 giờ thí nghiệm, trong khi đó hàm lượng tương đối của sáp tăng 40% so với lô đối chứng. Đến cuối thí nghiệm, hàm lượng tương đối của các axit béo tự do tăng lên 3 lần đối với *M. digitata* và 10 lần đối với *A. intermedia*, tuy nhiên hàm lượng này lại thay đổi không đáng kể đối với trường hợp của *S. capitalis*. Hàm lượng tương đối của triacylglycerol giảm đối với tất cả các loài thí nghiệm, trong khi đó hàm lượng sáp tăng 75% đối với loài *S. capitalis* và không đổi, đối với loài *A. intermedia*. Cần phải nhấn mạnh rằng, trong quá trình san hô bị tẩy trắng thì hàm lượng tương đối của các axit béo không no đa nối đôi giảm từ 2-5 lần, trong khi đó hàm lượng tương đối của các axit béo no lại tăng lên.



Hình 4. Sự biến động về hàm lượng tương đối của các lớp chất lipid xảy ra trong các loài san hô nghiên cứu trong khoảng thời gian thí nghiệm (TN)
a- *S. capitalis*; b- *M. digitata*; c- *A. intermedia*

PL: lipid phân cực, ST: steroid, FFA: axit béo tự do, TG: triacylglycerol, MADAG: monoanlydiacylglycerit, WX: sáp.

Trong khoảng thời gian nhiệt độ môi trường bất lợi ngắn, không những lipid dự trữ của san hô bị tiêu thụ mà lipid cấu trúc của san hô cũng bị thủy phân. Điều này cho thấy cấu trúc màng tế bào bị phá vỡ trong suốt quá trình thí nghiệm đồng thời với việc tế bào vật chủ san hô bị mất dần vì sinh vật cộng sinh với chúng. Trong quá trình này hàm lượng tương đối của các axit béo tự do tăng cao, đây là kết quả của quá trình lipid dự trữ bị thủy phân.

Hàm lượng malondiandehit và chlorophyll

Malondiandehit là một chất đánh dấu sinh học thường được sử dụng để đánh giá mức độ oxy hóa trong cơ thể sinh vật. Các kết quả thí nghiệm chỉ ra các loài san hô khác nhau có mức độ chống chịu khác nhau đối với điều kiện bất lợi oxy hóa sinh ra bởi quá trình gia tăng của nhiệt độ nước. Trong số 3 loài nghiên cứu, loài *M. digitata* có mức độ chống

chịu tốt nhất, tiếp theo là loài *S. Capitalis*, trong khi đó mức độ chống chịu kém nhất thuộc về loài *A. intermedia*. Sau 30 giờ thí nghiệm tại nhiệt độ nước biển 32°C, không quan sát thấy sự biến đổi đáng kể hàm lượng malondiandehit trong mô *M. digitata* giữa lô thí nghiệm và lô đối chứng. Tuy nhiên, hàm lượng này trong *S. capitalis* và *A. intermedia* tăng tương ứng 4 và 7 lần sau khi kết thúc thí nghiệm. Sự thay đổi hàm lượng malondiandehit này tương ứng với quá trình san hô bị tẩy trắng quan sát được với hai loài san hô này.

Tương tự sau 30 giờ thí nghiệm hàm lượng chlorophyll trong mô của *A. intermedia* và *S. capitalis* giảm tương ứng 90% và 65% so với lô đối chứng. Không có sự thay đổi đáng kể hàm lượng này giữa 2 lô thí nghiệm và đối chứng của loài *M. digitata* (bảng 1).

Bảng 1. Biến động hàm lượng malondiandehit và chlorophyll trong thời gian thí nghiệm

San hô TN	Malondiandehit		Chlorophyll	
	Đối chứng	Sau 30 giờ TN	Đối chứng	Sau 30 giờ TN
<i>Montipora digitata</i>	1,7 ± 0,6	2,0 ± 1,2	11,4 ± 1,3	7,8 ± 1,7
<i>Acropora intermedia</i>	2,2 ± 0,7	13,6 ± 0,8	9,4 ± 0,6	0,8 ± 0,1
<i>Sinularia capitalis</i>	1,2 ± 0,2	9,3 ± 1,2	10,7 ± 0,7	3,6 ± 0,5

KẾT LUẬN

Trong 3 loài san hô được nghiên cứu thì loài san hô cứng *Montipora digitata* thể hiện khả năng chống chịu yếu tố bất lợi về nhiệt độ hơn hẳn hai loài san hô còn lại. *Montipora digitata* cũng là loài không bị mất nhiều tảo cộng sinh zooxanthellae và chlorophyll nhất trong suốt thời gian thí nghiệm.

Trong quá trình san hô bị tẩy trắng, hàm lượng lipid tổng trong mô san hô giảm mạnh, ở thời điểm kết thúc thí nghiệm hàm lượng này giảm 60-75% so với lô đối chứng.

Cũng trong quá trình này không những lipid dự trữ của san hô bị tiêu thụ mà lipid cấu trúc của chúng của bị thủy phân. Cùng với lipid tổng, hàm lượng trong đối của triacylglycerol và sáp giảm trong quá trình san hô bị tẩy trắng, trong khi hàm lượng tương đối các axit béo tự do lại có xu hướng tăng mạnh. Tuy nhiên, không quan sát thấy sự thay đổi có ý nghĩa về mặt thống kê của hàm lượng của lipid phân cực và steroid trong quá trình thí nghiệm.

Lời cảm ơn: Công trình trên được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài hợp tác quốc tế cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số VAST.HTQT.Nga.02/2012-2013.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Muscatine L, McCloskey LR, Marian RE., 1981.* Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol. Oceanogr.* **26**: 601-611.
2. *Patton JS, Burris JE.* Lipid synthesis and extrusion by freshly isolated zooxanthellae (symbiotic algae). *Mar. Biol.* (1983) **75**: 131-136.
3. *Yamashiro H, Oku H, Higa H, Chinen I, Sakai K, 1999.* Composition of lipids, fatty acids and sterols in Okinawan corals. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* **122**:397-407.
4. *Pham QL, Nguyen VS, Trinh TTH, Doan LP, Pham MQ, Imbs AB, 2010.* Thành phần và hàm lượng lipid, axit béo trong zooxanthellae cộng sinh và mô vật chủ của một số loài san hô Việt nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48 (4A): 105-112.
5. *Nguyen VS, Pham QL, Chu QT, Le TH, Luu VH, Imbs AB, 2010.* Ảnh hưởng của sự tăng nhiệt độ lên thành phần và hàm lượng lipid, axit béo trong quá trình bị tẩy trắng nhân tạo của một số loài san hô Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48 (4A) : 334-339.
6. *Wilkinson C, 2000.* Status of Coral Reefs of the world Townsville: Australian Institute of Marine Science: 1-5.
7. *Glynn PW, 1993.* Coral reef bleaching ecological perspectives. *Coral Reefs* **12**: 1-17.
8. *Brown BE, 1997.* Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* **16**: 129-138.
9. *Hoegh-Guldberg O, 1999.* Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshwater Res.* **50**: 839-866.
10. *Bligh EG, Dyer WJ 1959.* A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-918.
11. *Yakovleva I, Hidaka M, 2004.* Differential recovery of PSII function and electron transport rate in symbiotic dinoflagellates as a possible determinant of bleaching susceptibility of corals. *Mar Ecol Prog Ser* **268**:43-53.

EFFECT OF ARTIFICIAL RAISING TEMPERATURE ON ZOOXANTHELLAE DENSITY, LIPID CONTENT, LIPID CLASS, FATTY ACID, MALONDIANDEHIT AND CHLOROPHYLL COMPOSITION OF SOME VIETNAMESE CORAL SPECIES

Nguyen Van Son¹, Pham Quoc Long¹, Pham Minh Quan¹,
Ha Viet Hai¹, Tran Thu Thuy¹, Imbs A.B²

¹*Institute of Natural Products Chemistry-VAST*

²*A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, FEB, RAS*

ABSTRACT: *There is a close symbiotic relationship between zooxanthellate corals and their symbionts, zooxanthellae. Zooxanthellae may provide up to 90% of total energy for corals; while they get nutrients, shelter, and protection from host corals. Due to high temperature stress, corals lose their symbionts and die. This phenomenon is called coral bleaching. It is believed that the coral bleaching is related to the biochemical compositions in corals. In this study, we determined the zooxanthellae density as well as the change of lipid content, lipid class and fatty acid composition between healthy and bleached corals. The results showed that zooxanthellae density steadily reduced during the coral bleaching. When corals were beached, half of total lipid contents of corals lost. There was no significant change in the relative percentage of structural and storage lipids. However, there was remarkable change in the fatty acid composition. Completely bleached corals contained a significantly lower amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), but higher amount of saturated fatty acids (SAFAs) and monounsaturated fatty acids (MUFAs) than those in healthy corals.*

Keywords: *corals, zooxanthellae, fatty acids, symbionts, bleaching*