

PHÁT HIỆN *Bacillus* sp. VK2 PHÂN LẬP TỪ *Acropora hyacinthus* Ở NINH THUẬN KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH “WHITE POX” CHO SAN HỒ *Acropora palmata*

Phạm Thị Miên*, Nguyễn Ngọc Thắng, Nguyễn Kim Hạnh

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

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

Ngày nhận bài: 6-10-2016 / Ngày chấp nhận đăng: 25-5-2017

TÓM TẮT: Vi khuẩn sống cùng san hô và vai trò của chúng đối với vật chủ hiện đang là một trong những hướng nghiên cứu mới và thu hút các nhà khoa học toàn thế giới. Trong nghiên cứu vi sinh vật sống cùng một số loài san hô cứng ở Hang Rái, Ninh Thuận, vi khuẩn sống cùng san hô *Acropora hyacinthus* chủng VK2 được phát hiện là chiếm ưu thế trong tổng số vi khuẩn dị dưỡng hiếu khí. Vi khuẩn này được xác định đến giống, tách chiết chất thô và thử nghiệm khả năng kháng khuẩn với 4 chủng vi khuẩn chuẩn *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Salmonella typhimurium* ATCC6994, *Escherichia coli* O157 và *Serratia marcescens* PDL100 trên môi trường Mueller Hinton Agar bằng phương pháp khuếch tán thạch. Vi khuẩn VK2 được xác định là *Bacillus* sp. VK2. Kết quả khả năng kháng sinh cho thấy chủng này kháng lại vi khuẩn *Serratia marcescens* PDL100 là vi khuẩn gây đại dịch bệnh “white pox” ở san hô *Acropora palmata* thành phần đặc trưng của đảo san hô Florida Keys, Hoa Kỳ. Tuy nhiên *Bacillus* sp.VK2 không kháng lại các vi khuẩn kiểm định khác.

Từ khóa: Hoạt động kháng khuẩn, *Bacillus* sp. VK2, *Acropora hyacinthus*, Ninh Thuận.

MỞ ĐẦU

Trên thế giới đã có một số nghiên cứu chỉ ra các tác nhân gây bệnh cho san hô, ví dụ bệnh tẩy trắng ở san hô *Oculina patagonica* là do vi khuẩn gây bệnh cơ hội *Vibrio shiloi* [1], còn *Vibrio coralliilyticus* gây bệnh tẩy trắng cho san hô *Pocillopora damicornis* [2]. Những nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, hai vi khuẩn gây bệnh kể trên là những vi khuẩn gây bệnh cơ hội chịu tác động lớn bởi sự biến thiên nhiệt độ [3]. Trong khi bệnh dải đen (back band) xuất hiện ở nhiều loài san hô được xác định là do một hợp phần gồm nhiều vi sinh vật gây ra bao gồm *Cyanobacteria* sp., *Cytophaga* sp., *Beggiatoa* sp., *Desulfovibrio* sp. [4]. Bệnh mảng trắng (white plague II) ở san hô *Montastraea* là do vi khuẩn Gram-âm *Aurantimonas corallicida* gây ra [5].

San hô *Acropora palmata* là một trong những thành phần chủ yếu tạo nên rạn san hô vùng nước cạn ở đảo san hô Florida Keys nằm ngoài khơi bờ biển Florida, Hoa Kỳ đã ghi nhận bị bệnh xuất hiện những đốm trắng hoặc mảng trắng trên thân lần đầu tiên vào năm 1996 trên rạn san hô Eastern Dry Rocks Reef, thuộc đảo san hô Key West, Florida Keys [6]. Sự sụt giảm nghiêm trọng về tỷ lệ mô san hô với trung bình 2,5 cm³ mỗi ngày và đặc biệt gia tăng khi nhiệt độ lên cao đã dẫn đến hơn 70% diện tích rạn san hô bị tàn phá vào cuối năm 1999 đầu năm 2000. Nguyên nhân gây bệnh cho san hô tạo rạn *A. palmata* ở Florida Keys và các nơi khác thuộc vùng biển Caribe lân cận đã được xác định là do vi khuẩn *S. marcescens* chủng PDL100 gây ra [7, 8]. Patterson, người đã tìm ra *S. marcescens* từ mô tổn thương của san hô

A. palmata đề nghị gọi bệnh do vi khuẩn này gây ra là serratiosis acroporid hay bệnh đốm trắng (white pox diseases-WPD). Biểu hiện của bệnh này là những đốm trắng hoặc vết trắng bất thường và dẫn đến mất mô san hô nhằm phân biệt với các bệnh khác, vì đa số các bệnh trên san hô đều có những dấu hiệu tương đối giống nhau khi quan sát bằng mắt thường ví dụ xuất hiện màu trắng, có thể là một dải, một đốm hoặc một mảng trắng nhưng không do *S. marcescens* gây ra [8]. Vi khuẩn *S. marcescens* PDR60 đã được cho là nguyên nhân gây ra đại dịch bệnh đốm trắng bùng phát vào năm 2002 và 2003, khi chúng này được đồng thời tìm thấy ở các mẫu nước thu trong rạn san hô và trong nước thải của con người từ các đảo gần quần đảo Florida Keys và ở san hô *A. palmata* bệnh [9, 10]. Tuy nhiên, cũng ở Florida Keys và các nơi khác trong vùng biển Caribe, các nhà nghiên cứu đã báo cáo rằng *S. marcescens* không phải lúc nào cũng được phân lập từ các mẫu san hô có những biểu hiện bệnh đốm trắng [11, 12]. Bệnh đốm trắng đã được ghi nhận ở bốn trong sáu rạn san hô ở Florida Keys vào các đợt khảo sát từ năm 2011 và 2013, *S. marcescens* đã được phát hiện ở các thương tổn có biểu hiện bệnh đốm trắng trong dịch nhầy (mucus) san hô khỏe mạnh thu mẫu ở khu vực đang diễn ra bệnh và khu vực lân cận không có bệnh. *S. marcescens* đã được phát hiện trong san hô *A. palmata* với tần suất lớn hơn trong nước gần tập đoàn. Tuy nhiên, không giống như những lần đại dịch đã xảy ra, không xuất hiện san hô chết cả tập đoàn cho dù tổn thương do bệnh đốm trắng đã được quan sát thường xuyên trên các rạn san hô. *S. marcescens* không được phân lập từ *A. palmata* nhưng được phân lập từ các tập đoàn lành mạnh của các loài san hô khác và được xác định là chủng gây bệnh *S. marcescens* PDR60 [13].

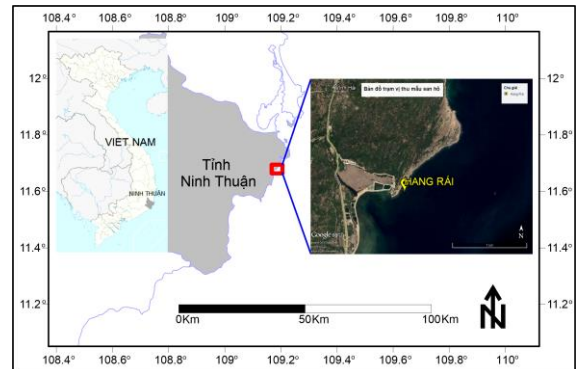
Khả năng kháng khuẩn của san hô cứng đã được nghiên cứu trong một số công trình của Koh [15], Geffe và Rosenberg [16]. Tuy nhiên cả hai công trình này đều nghiên cứu khả năng kháng khuẩn từ chất chiết của san hô, không nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của vi sinh vật sống cùng san hô.

Chủng VK2 xuất hiện với tần suất cao trong tất cả các mẫu san hô *Acropora*

hyacinthus bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống, do đó vi khuẩn này được nghiên cứu sâu hơn về khả năng kháng khuẩn. Đây là công bố đầu tiên được thực hiện tại Việt Nam về vi khuẩn sống cùng san hô cứng biển Việt Nam có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh đốm trắng cho san hô *A. palmata*.

PHƯƠNG PHÁP

Địa điểm và thời gian thu mẫu, xử lý mẫu



Hình 1. Bản đồ vị trí lấy mẫu

Mẫu san hô sống được thu một cành dài từ 3 - 7 cm qua thợ lặn có khí tài (SCUBA) ở độ sâu 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) ngày 4/8/2016. Nhiệt độ nước biển tại thời điểm thu mẫu là $27,95 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$, độ mặn nước biển là 34,6‰. San hô được thu vào túi nilon vô trùng, bảo quản trong tối và đặt vào thùng đá lạnh vận chuyển về phòng thí nghiệm trong thời gian nhanh nhất có thể, ngay sau đó được thực hiện các thí nghiệm.

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 (lọc qua màng lọc Anodisc 0,02 μm (Whatman) để được nồng độ 10^{-1}). Mẫu san hô ($n=3$) dùng để đếm tổng số vi khuẩn bằng kính hiển vi huỳnh quang được cố định với formaldehyde đến nồng độ cuối cùng 3%, làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng và bảo quản ở -80°C cho đến khi phân tích. Các mẫu san hô cố định trong formaldehyde được xử lý với dung dịch potassium citrate 1%, sau đó được lọc qua màng lọc Anodisc 0,02 μm và nhuộm với SYBR Gold (Invitrogen) [17]. Tổng số vi

khuẩn, hình dạng vi khuẩn (hình cầu, que,...) sẽ được đọc với kính hiển vi huỳnh quang Olympus Provis AX70 và xử lý hình ảnh với phần mềm chụp ảnh kỹ thuật số (Olympus-DP71). Đếm vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn ($n=3$): Vi khuẩn được cấy truyền liên tiếp đến nồng độ 10^{-8} vào môi trường 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). Từ 2 nồng độ pha loãng liên tiếp có vi khuẩn mọc, cấy trang lên môi trường Nutrient agar (NA-Himedia, Ấn Độ) có bổ sung NaCl đến nồng độ cuối cùng 3% và tính theo công thức: $A(CFU/g) = N / (n_1 V f_1 + \dots + n_i V f_i)$. A: Đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU/g) mẫu. N: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn; n_1, n_i : Số lượng đĩa cấy 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.

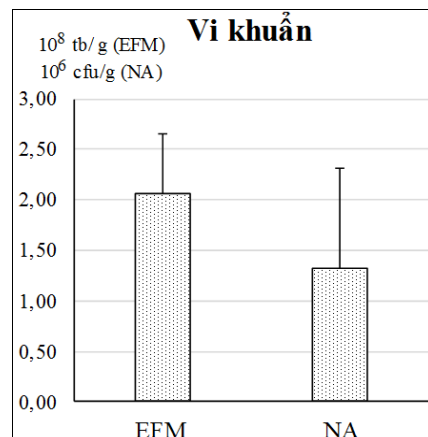
Vi khuẩn VK2 được phân lập đến thuần trên môi trường NA có bổ sung NaCl 3%. Hình dạng khuẩn lạc và các đặc điểm hình thái được ghi chú, xác định Gram dựa trên kết quả phản ứng KOH [18]. Nhuộm đơn tế bào vi khuẩn, soi dưới kính hiển vi, hình ảnh tế bào được chụp và xử lý bằng phần mềm chụp ảnh kỹ thuật số (Olympus-DP71). Vi khuẩn được kiểm tra khả năng di động, phản ứng catalase, phản ứng sinh Indol, sinh H_2S , khử Nitrat, V-P, sử dụng glucose, citrate, maltose, sac, lac, arabinose, thủy phân tinh bột và đối chiếu kết quả với bảng phân loại của Bergey [19]. Khả năng kháng khuẩn của chủng VK2 được kiểm tra dựa theo nguyên lý khuếch tán thạch của Bauer và nnk., [20]. Vi khuẩn kiểm định dùng trong nghiên cứu này gồm *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Salmonella typhimurium* ATCC6994, *Escherichia coli* O157, *Serratia marcescens* PDL100 trong đó có chủng vi khuẩn *S. marcescens* PDL100 gây bệnh cho san hô cứng *A. palmata*. Vi khuẩn kiểm định được chuẩn bị trong môi trường SWB nuôi lắc 120 rpm ở $37^\circ C$ trong 24 giờ, riêng *S. marcescens* nuôi ở $25^\circ C$, dùng 0,1 ml dịch nuôi cấy trang lên các đĩa thạch có chứa môi trường Mueller Hinton Agar (MHA-Himedia, Ấn Độ). Chủng VK2 được nuôi thu sinh khối trong bình tam giác chứa 100 ml môi trường SWB, nuôi lắc 120 rpm, ở $30^\circ C$ trong 72 giờ. Chất thô có

trong sinh khối được tách chiết bằng ethyl acetate (Trung Quốc) với tỉ lệ 1/1 (v/v), lắc 120 rpm ở nhiệt độ $30^\circ C$ cho đến khi khô, thu hồi chất chiết thô với 1 ml methanol (Merck). Mỗi 30 μ l dịch chiết chất thô được nhỏ vào 4 giếng đã chuẩn bị sẵn trên MHA có cấy 0,1 ml dịch nuôi các vi khuẩn kiểm định. Đường kính vòng vô khuẩn sẽ được tính bằng giá trị trung bình đo được của 4 giếng không bao gồm đường kính giếng. Methanol được dùng làm đối chứng âm cho tất cả các chủng.

Toàn bộ số liệu được xử lý trên phần mềm thống kê R -R Development Core Team [21], bản đồ trạm vị thu mẫu được xây dựng trên phần mềm Surfer và MapInfo.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tổng số vi khuẩn trong san hô qua nuôi cấy và đếm trực tiếp bằng kính hiển vi quang học huỳnh quang. Tổng vi khuẩn dị dưỡng qua phương pháp đếm huỳnh quang (EFM) và tính toán qua phương pháp pha loãng tới hạn (NA) được trình bày trong hình 2 biểu diễn giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.



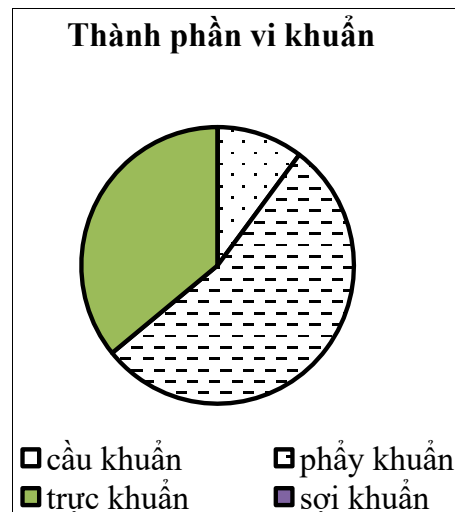
Hình 2. Tổng vi khuẩn dị dưỡng qua EFM và NA

Tổng số vi sinh vật hiếu khí trong 1 g san hô là $1,32 \pm 0,98 \times 10^6$ CFU/g trong khi tổng số vi khuẩn dị dưỡng đếm trực tiếp từ phương pháp nhuộm và đếm huỳnh quang là $2,07 \pm 0,58 \times 10^8$ tế bào/g. Qua hình 2 cho thấy vi khuẩn có mật thực sự trong san hô lớn hơn 200 lần so với vi khuẩn có thể nuôi cấy. Trong nghiên cứu này vi khuẩn được đồng nhất trong nước biển lọc qua màng lọc 0,02 μ m đã hạn

chế tối đa vi khuẩn bên ngoài xâm nhiễm và cây 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 san hô cứng *A. hyacinthus* cao hơn so với nghiên cứu vi sinh vật trong 4 loài san hô mềm tại vịnh Nha Trang [22]. Số lượng về vi khuẩn sống cùng *A. hyacinthus* đếm dưới kính hiển vi huỳnh quang trong nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu khác [23, 24] khi thực hiện trên đối tượng san hô cứng khác ở vịnh Nha Trang.

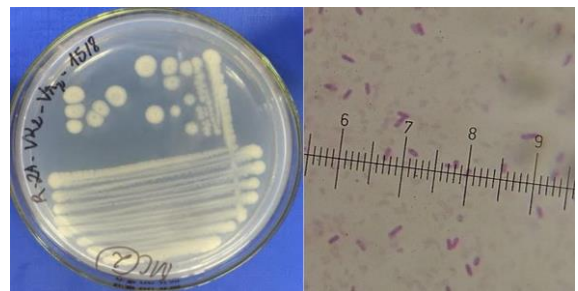
Thành phần vi khuẩn qua đếm trực tiếp dưới kính hiển vi huỳnh quang, được biểu diễn bởi phần trăm trong tổng số 100% vi khuẩn đếm được trên 1 g mẫu san hô tươi (hình 3). Qua hình 3 cho thấy vi khuẩn có hình phẩy khuẩn (comma) chiếm ưu thế (54%), tiếp theo là trực khuẩn (36%) và cầu khuẩn chiếm 10%, không xuất hiện sợi khuẩn. Song song với đếm vi khuẩn dị dưỡng qua nhuộm đếm trực tiếp, nghiên cứu này cũng thực hiện nuôi cấy phân lập vi sinh vật ưu thế trên môi trường thạch, đặc biệt nhóm vi khuẩn gây bệnh cơ hội *Vibrio* với hình dạng phẩy khuẩn đặc trưng cũng đã được chú trọng nghiên cứu nuôi cấy trên môi trường đặc hiệu TCBS. Kết quả là *Vibrio* có xuất hiện trên TCBS (không đính kèm dữ liệu), tuy nhiên đã không phát triển khi được cấy truyền tiếp theo sang môi trường mới. Do đó không thể phân lập và định danh đến loài. 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 [25], trong san hô cứng *Mussismilia hispida* ở biển Brazil [26] và san hô cứng *Acropora hyacinthus*, *Stylophora pistillata* ở Great Barrier Reef, Australia [27]. Trong nghiên cứu này không có vi khuẩn *Vibrio* nào được phân lập và định danh mặc dù có một vài khuẩn lạc có thể là *Vibrio* hoặc cũng có thể là nhóm khác đã xuất hiện trên môi trường TCBS. Có thể *Vibrio* trong san hô *A. hyacinthus* cần một chất dinh dưỡng hay điều kiện nuôi cấy đặc biệt nào đó 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 [28].



Hình 3. Thành phần vi sinh vật qua đếm trực tiếp với kính hiển vi huỳnh quang

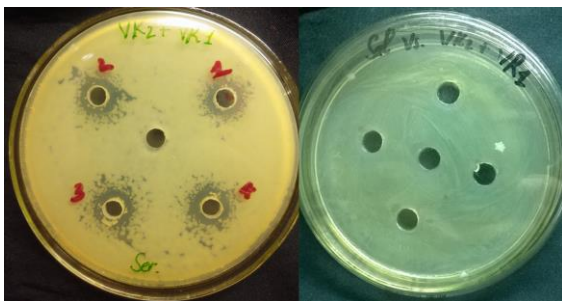
Hình dạng khuẩn lạc và tế bào VK2. Vi khuẩn VK2 với khuẩn lạc có màu trắng xốp, đường kính khuẩn lạc 0,3 - 0,5 mm có xuất hiện vòng tròn đồng tâm, tâm khuẩn lạc nhầy và có màu đục sau 24 giờ nuôi cấy. Kiểm tra phản ứng KOH, và các phản ứng sinh hóa đặc trưng cho biết chủng VK2 vi khuẩn Gram dương hiếu khí, có khả năng di động, khuẩn lạc có màu trắng, mép loang ra xung quanh, bề mặt khuẩn lạc phẳng trơn láng, tế bào hình que, kích thước tế bào khoảng $0,6 \times 2,0 \mu\text{m}$, có bào tử trung tâm (hình 4). Theo hệ thống phân loại hình thái của Bergey (1984) thì chủng VK2 được xác định là *Bacillus* sp. và được đặt tên là *Bacillus* sp. VK2.



Hình 4. Hình dạng, kích thước tế bào và khuẩn lạc

Trong nghiên cứu này chủng VK2 chiếm ưu thế và được lựa chọn để nghiên cứu tiếp theo, quan sát qua kính hiển vi huỳnh quang trực khuẩn cũng chiếm tỷ lệ cao trong số 4 nhóm quan sát được. Vi khuẩn sống cùng san hô *Antipathes dichotoma* ở Biển Đông được khám phá khả năng kháng sinh, bên cạnh những nhà sản xuất chính như *Actinobacteria*, những thành viên thuộc chi *Bacillus* cũng được công bố là nguồn của các chất kháng sinh. Bên cạnh đó không có một thành viên nào thuộc *Gammaproteobacteria* được công bố [29]. Chi *Bacillus* là vi sinh vật ưu thế nhất trong số vi sinh vật phân lập từ 4 loài san hô quạt *Dichotella gemmacea*, *Melitodes squamata*, *Muricella flexuosa* và *Subergorgia suberosa* ở Biển Đông [30]. Tuy nhiên, nghiên cứu trên san hô nấm *Fungia scutaria* ở Biển Đỏ, không có chủng nào thuộc chi này được phân lập [31].

Khả năng kháng khuẩn của VK2



Hình 5. VK2 kháng *S. marcescens* (trái) và *S. typhimurium* (phải)

Chủng VK2 kháng vi khuẩn gây bệnh *S. marcescens* (hình 5) với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình là 6 mm (SD±0,35). Đối với các chủng kiểm định còn lại chủng VK2 không thể hiện khả năng kháng khuẩn. Nghiên cứu tìm kiếm các chủng sinh kháng sinh từ san hô sừng Elkhorn coral *A. palmate* chỉ ra *Bacillus megaterium* và *Exiguobacterium* sp. vừa là những chủng có mối tương quan mật thiết đối với vật chủ san hô, chúng cũng là những chủng sinh kháng sinh, *Bacillus megaterium* kháng lại *Bacillus subtilis*, trong khi *Exiguobacterium* sp. kháng lại *S. marcescens* PDL100-chủng gây bệnh white pox cho vật chủ [32]. Chủng VK2 trong nghiên cứu này là chủng chiếm ưu thế khi nuôi cấy trên môi trường thạch, tuy nhiên chưa

kháng định được chủng VK2 có mối quan hệ mật thiết với vật chủ san hô hay không, để kháng định mối quan hệ này thì cần có những nghiên cứu sâu hơn.

Đã có công trình của Shnit-Orland và Kushmaro [33] thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn sống cùng 6 loài san hô cứng và 2 loài san hô mềm phổ biến ở Biển Đỏ với vi khuẩn kiểm định *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio coralliilyticus* và *S. marcescens*. Vi khuẩn sống cùng chất nhầy san hô khối và san hô tạo rạn đặc biệt là các chủng thuộc chi *Vibrio* và *Pseudoalteromonas* thể hiện khả năng kháng sinh mạnh đối với cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Trong khi các chủng thuộc chi *Bacillus* và *Planomicrobium* thể hiện khả năng kháng sinh tương đối thấp và chủ yếu kháng lại các vi khuẩn Gram dương. Tính trên tổng số vi khuẩn được thử khả năng kháng sinh có 25% đến 70% các chủng có hoạt động kháng khuẩn. Tuy nhiên không có chủng nào kháng lại vi khuẩn gây *S. marcescens* bệnh cho san hô sừng *A. palmata*. Hoạt động kháng khuẩn nổi trội của chủng *Pseudoalteromonas* và *Vibrio* kháng lại cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm đã khiến chúng trở nên được quan tâm và đề nghị rằng chủng này có thể thích hợp để làm “Probiotic-là chủng vi khuẩn có lợi” cho san hô, giúp vật chủ khỏe mạnh bằng cách đưa chủng này vào “hộp phân” của san hô gồm bản thân san hô, vi tảo cộng sinh, vi khuẩn virus và các sinh vật sống cùng khác được gọi là coral holobiont, để chúng có thể điều hòa tiết chế các hoạt động của vi sinh vật sống cùng theo hướng có lợi cho vật chủ, nhất là trong những điều kiện khó khăn như căng thẳng vì môi trường do nhiệt độ, độ mặn và các yếu tố khác gây bất lợi cho san hô [34]. Đáng chú ý là trước đó Reshef và nnk., [35] đã đưa ra thuyết “Probiotic”- đó là đưa vi khuẩn có lợi vào san hô, vi khuẩn này sẽ giúp ích cho san hô chống lại những tác nhân bất lợi từ bên ngoài, thuyết này có nhiều điểm phù hợp với tình hình thực tế hiện nay khi tìm kiếm tác nhân gây bệnh cho san hô. *Vibrio* là nhóm vi khuẩn gây bệnh cơ hội phổ biến trong môi trường nước, chúng cũng là những nhà sản xuất các chất kháng sinh. *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio natriegens* phân lập từ san hô cứng *A. digitifera* ở vịnh Mannar

có hoạt động kháng khuẩn mạnh chống lại vi khuẩn kiểm định [25]. Nghiên cứu vi sinh vật từ san hô đen *A. dichotoma* công bố chi *Bacillus* sp. chiếm ưu thế và cũng là nhóm có hoạt động kháng khuẩn mạnh nhất [29]. Kết quả tương đồng với nghiên cứu tìm kiếm các chất hoạt tính từ vi sinh vật sống cùng san hô mềm *Alcyonium digitatum* ở biển Baltic, chi *Bacillus* sp. chiếm ưu thế trong các vi khuẩn có thể nuôi cấy được đồng thời thể hiện khả năng kháng khuẩn cao [36].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Đây là kết quả bước đầu ghi nhận vi khuẩn sống cùng san hô cứng *A. hyacinthus* tại Hang Rái, Ninh Thuận có khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh *S. marcescens* nguyên nhân gây bệnh đốm trắng cho *A. palmata* san hô tạo rạn của Florida Keys, Hoa Kỳ. Vi khuẩn này được xác định là *Bacillus* sp. chủng VK2. Để tìm hiểu sâu hơn về khả năng kháng sinh cũng như khả năng sử dụng chủng VK2 cho những nghiên cứu sinh thái san hô, cần thử nghiệm khả năng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh cơ hội sống cùng *A. hyacinthus* ở Hang Rái. Xa hơn nữa, vi khuẩn sống cùng san hô đang là xu hướng nghiên cứu trên thế giới hiện nay, mối tương tác giữa vi sinh vật và vật chủ san hô cũng như vai trò của vi khuẩn đối với sinh thái rạn san hô vẫn là những vấn đề cần tìm hiểu và thảo luận.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện bằng nguồn kinh phí cấp cho đề tài cơ sở năm 2016 của phòng Sinh thái biển và nhận được một phần hỗ trợ vật tư hóa chất từ đề tài trẻ 2016 của tiến sỹ Nguyễn Kim Hạnh phòng Sinh thái biển, Viện Hải dương học. Chúng tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành đến anh Phan Kim Hoàng phòng Nguồn lợi thủy sinh, Viện Hải dương học đã thực hiện thu mẫu và phân loại san hô cứng *A. hyacinthus*. Chúng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến tiến sỹ Michael Tedengren Trường Đại học Stockholm Thụy Điển đã cung cấp các chủng vi khuẩn chuẩn, dùng làm vi khuẩn kiểm định trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., and Loya, Y., 1997. Bleaching of the coral

- Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series*, **147**, 159-165.
2. Ben-Haim, Y., and Rosenberg, E., 2002. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, **141**(1), 47-55.
3. Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., and Rosenberg, E., 2003. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(7), 4236-4242.
4. Frias-Lopez, J., Zerkle, A. L., Bonheyo, G. T., and Fouke, B. W., 2002. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Applied and environmental microbiology*, **68**(5), 2214-2228.
5. Denner, E. B., Smith, G. W., Busse, H. J., Schumann, P., Narzt, T., Polson, S. W., ... and Richardson, L. L., 2003. *Aurantimonas coralicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**(4), 1115-1122.
6. Holden, C., 1996. Coral disease hot spot in Florida Keys. *Science*, **274**(5295), 2017.
7. Miller, S., Chiappone, M., Rutten, L. M., and Swanson, D. W., 2008. Population status of *Acropora* corals in the Florida Keys.
8. Patterson, K. L., Porter, J. W., Ritchie, K. B., Polson, S. W., Mueller, E., Peters, E. C., Santavy, D. L., and Smith, G. W., 2002. The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(13), 8725-8730.
9. Sutherland, K. P., Porter, J. W., Turner, J. W., Thomas, B. J., Looney, E. E., Luna, T. P., Meyers, M. K., Futch, J. C., and Lipp, E. K., 2010. Human sewage identified as likely source of white pox disease of the threatened Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Environmental Microbiology*, **12**(5), 1122-1131.
10. Sutherland, K. P., Shaban, S., Joyner, J. L., Porter, J. W., and Lipp, E. K., 2011. Human pathogen shown to cause disease in the threatened elkhorn coral *Acropora palmata*. *PloS One*, **6**(8), e23468.

11. Polson, S. W., Higgins, J. L., and Woodley, C. M., 2008. PCR-based assay for detection of four coral pathogens. *Proc. 11th Int. Coral Reef Symp., Ft Lauderdale, FL*, 251-255.
12. Lesser, M. P., and Jarett, J. K., 2014. Culture-dependent and culture-independent analyses reveal no prokaryotic community shifts or recovery of *Serratia marcescens* in *Acropora palmata* with white pox disease. *FEMS Microbiology Ecology*, **88**(3), 457-467.
13. Joyner, J. L., Sutherland, K. P., Kemp, D., Berry, B., Griffin, A., Porter, J., Amador, M. H. B., Noren, H. K. G., and Lipp, E. K., 2015. Systematic analysis of white pox disease in *Acropora palmata* of the Florida Keys and the role of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-00116.
14. Koh, E. G., 1997. Do scleractinian corals engage in chemical warfare against microbes?. *Journal of Chemical Ecology*, **23**(2), 379-398.
16. Geffen, Y., and Rosenberg, E., 2005. Stress-induced rapid release of antibacterials by scleractinian corals. *Marine Biology*, **146**(5), 931-935.
17. Leruste, A., Bouvier, T., and Bettarel, Y., 2012. Enumerating Viruses in Coral Mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(17), 6377-6379.
18. Halebian, S., Harris, B., Finegold, S. M., and Rolfe, R. D., 1981. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **13**(3), 444-448.
19. Holt, J. G., and Sneath, P. H., 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, London. Vol 2.
20. Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, **45**(4_{ts}), 493-496.
21. Team, R. C., 2012. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>.
22. Phạm Thị Miên, Võ Hải Thi, Lê Hoài Hương và Hoàng Xuân Bền, 2010. Phân lập vi khuẩn từ san hô mềm *Simularia* spp. và thử nghiệm hoạt tính kháng Tetracycline, Gentamicin, Cefazolin của chúng. *Tuyển Tập nghiên cứu biển*, Tập XVII, 183-195.
23. 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.
24. Nguyen-Kim, H., Bouvier, T., Bouvier, C., Doan-Nhu, H., Nguyen-Ngoc, L., Rochelle-Newall, E., Baudoux, C. A., Desnues, C., Reynaud, S., Ferrier-Pages, S., and Bettarel, Y., 2014. High occurrence of viruses in the mucus layer of scleractinian corals. *Environmental Microbiology Reports*, **6**(6), 675-682.
25. 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.
26. De Castro, A. P., Araújo, S. D., Reis, A. M., Moura, R. L., Francini-Filho, R. B., Pappas, G., Rodrigues, T. G., 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.
27. 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.
28. Simon, C., and Daniel, R., 2011. Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(4), 1153-1161.
29. Zhang, X., Sun, Y., Bao, J., He, F., Xu, X., and Qi, S., 2012. Phylogenetic survey and antimicrobial activity of culturable microorganisms associated with the South China Sea black coral *Antipathes dichotoma*. *FEMS Microbiology Letters*, **336**(2), 122-130.
30. Peng, J., Zhang, X., Xu, X., He, F., and Qi, S., 2013. Diversity and chemical defense role of culturable non-actinobacterial bacteria isolated from the South China Sea

- (Bien Dong Sea) gorgonians. *J. Microbiol Biotechnol*, **23**(4), 437-43.
31. Lampert, Y., Kelman, D., Dubinsky, Z., Nitzan, Y., and Hill, R. T., 2006. Diversity of culturable bacteria in the mucus of the Red Sea coral *Fungia scutaria*. *FEMS microbiology ecology*, **58**(1), 99-108.
 32. Ritchie, K. B., 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, **322**, 1-14.
 33. Shnit-Orland, M., and Kushmaro, A., 2009. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS Microbiology Ecology*, **67**(3), 371-380.
 34. Shnit-Orland, M., Sivan, A., and Kushmaro, A., 2012. Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the coral holobiont. *Microbial Ecology*, **64**(4), 851-859.
 35. Reshef, L., Koren, O., Loya, Y., Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E., 2006. The coral probiotic hypothesis. *Environmental Microbiology*, **8**(12), 2068-2073.
 36. 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.

Bacillus* sp. VK2 ISOLATED FROM *Acropora hyacinthus* FROM NINH THUAN AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITIES AGAINST CAUSE OF WHITE POX DISEASE IN *Acropora palmate

Pham Thi Mien, Nguyen Ngoc Thang, Nguyen Kim Hanh

Institute of Oceanography, VAST

ABSTRACT: Coral associated bacteria and their role for the host are currently one of the interested issues for research and scientists worldwide. Search of associated bacteria with some species of hard coral in Hang Rai, Ninh Thuan found that the strain VK2 was the most abundant culture from *Acropora hyacinthus*. This bacterium was implicated to further study for antimicrobial tests with *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Salmonella typhimurium* ATCC6994, *Escherichia coli* O157, and *Serratia marcescens* PDL100 by agar diffusion method on MHA. The bacterium was identified as *Bacillus* sp. VK2. This strain showed inhibition of *Serratia marcescens* strain PDL100- as pandemic white pox disease for elkhorn coral *Acropora palmata* in Florida Keys, USA. However *Bacillus* sp. strain VK2 showed no inhibition against other indicators.

Keywords: Antimicrobial activity, *Bacillus* sp. VK2, *Acropora hyacinthus*, Ninh Thuan.