

TƯƠNG QUAN GIỮA VI RÚT VÀ VI KHUẨN TRONG LỚP DỊCH NHẦY SAN HÔ VÙNG CÁT BÀ VÀ LONG CHÂU, VIỆT NAM

Phạm Thế Thư

Viện Tài nguyên và Môi trường Biển, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, thupt@imer.ac.vn

TÓM TẮT: Vi khuẩn có vai trò quan trọng đối với sức khỏe của san hô, nhưng lại chưa nghiên cứu. Bài báo này đề cập đến mối tương quan giữa mật độ vi rút và các đặc điểm quần xã vi khuẩn (mật độ, đa dạng di truyền, hoạt động) trong dịch nhầy của 12 loài san hô có phân bố ở khu vực Cát Bà và Long Châu, Hải Phòng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mật độ vi rút có tương quan thuận với mật độ vi khuẩn ($R=0,500$; $p=0,041$) và tương quan nghịch với đặc điểm hoạt động hô hấp ($R=-0,611$; $p=0,009$), khả năng hấp thụ chất hữu cơ ($R=-0,522$; $p=0,032$) của quần xã vi khuẩn. Do đó, vai trò của vi rút liên quan tới sức khỏe của san hô được thể hiện bởi vai trò kiểm soát mật độ vi khuẩn và hoạt động của quần xã vi khuẩn sống trong san hô.

Từ khóa: Chất nhầy san hô, san hô, vi rút, vi khuẩn.

MỞ ĐẦU

Hệ sinh thái rạn san hô có sự đa dạng sinh học cao, đóng vai trò quan trọng trong các thủy vực biển [11]. Nhưng các hệ sinh thái rạn san hô đã và đang bị suy giảm mạnh do sự tác động từ thiên nhiên và con người [18]. Trong đó, dịch bệnh cũng là một trong những nguyên nhân chính đang gây ảnh hưởng đến rạn san hô trên toàn thế giới [19]. Việc xác định nguyên nhân gây dịch bệnh trên san hô hiện vẫn gặp rất nhiều khó khăn, do đó, các nghiên cứu về quá trình sinh thái và sinh lý dẫn đến các bệnh san hô, trong đó có vai trò của vi rút, vi khuẩn rất quan trọng.

San hô khỏe mạnh, hệ vi sinh vật trên chúng (vi khuẩn, nấm, vi tảo...) tạo thành tập đoàn sinh vật gọi là holobiont san hô. Trong đó, hệ vi sinh vật trong lớp chất nhầy được cho là có liên quan mật thiết với sức khỏe và các loại bệnh của san hô [22]. Vi khuẩn đã được chứng minh có vai trò quan trọng đối với san hô thông qua các chức năng khác nhau [22], cụ thể như chức năng dinh dưỡng [14] và bảo vệ [24]. Mặc dù, trong môi trường thủy vực, vi rút đã được nghiên cứu nhiều và các chức năng quan trọng của chúng đã được xác định [21], thí dụ như chức năng tái tạo chất dinh dưỡng [16], kiểm soát sự nở hoa của tảo [4], là dinh dưỡng cho sinh vật đơn bào [5], vận chuyển các vật liệu di truyền ngang giữa các sinh vật [12] và đặc biệt, vi rút là yếu tố quan trọng nhất trong việc kiểm

soát mật độ vi khuẩn trong các thủy vực [8]. Nhưng trên san hô, vi rút mới chỉ được ghi nhận có trong mô san hô [6], trong vi tảo zooxanthellae cộng sinh san hô [25] và có mật độ cao trong chất nhầy san hô [13]. Tuy nhiên, vai trò của vi rút sống trên san hô vẫn chưa được biết, nhưng khả năng vi rút cũng có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát số lượng và chức năng của quần xã vi khuẩn trên san hô.

Đặc biệt, những thông tin về vi rút, vi khuẩn trong holobiont san hô và chức năng sinh thái của chúng là cơ sở quan trọng trong việc xác định vai trò của chúng liên quan tới sức khỏe san hô. Để góp phần làm sáng tỏ các vấn đề trên, bài báo này cung cấp một số thông tin chứng tỏ có sự tồn tại sự tương quan giữa vi rút và vi khuẩn trong môi trường chất nhầy san hô.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu là các mẫu nước biển và dịch nhầy của 12 loài san hô được thu tại khu vực ven đảo Cát Bà và Long Châu, Hải Phòng vào thời điểm 10-15h 29-30/05/2012: *Pavona frondifera*, *P. decussata*, *Fungia fungites*, *Sandalithia robusta*, *Goniastrea pectinata*, *Lobophyllia flabelliformis*, *L. hemprichii*, *Acropora hyacinthus*, *A. pulchra*, *Echinopora lamellosa*, *Favites pentagona* và *Platygyra carnosus*. Với mỗi loài san hô và mẫu nước được thu lặp lại từ 3 đến 6 mẫu cho phân tích so sánh.

Phương pháp thu mẫu ngoài hiện trường

Phương pháp lặn có khí tài (SCUBA) được sử dụng trong việc thu mẫu san hô và nước môi trường xung quanh (Nước MT). Dịch nhầy san hô được thu ngay ngoài hiện trường theo phương pháp của Garren & Azam (2010) [10].

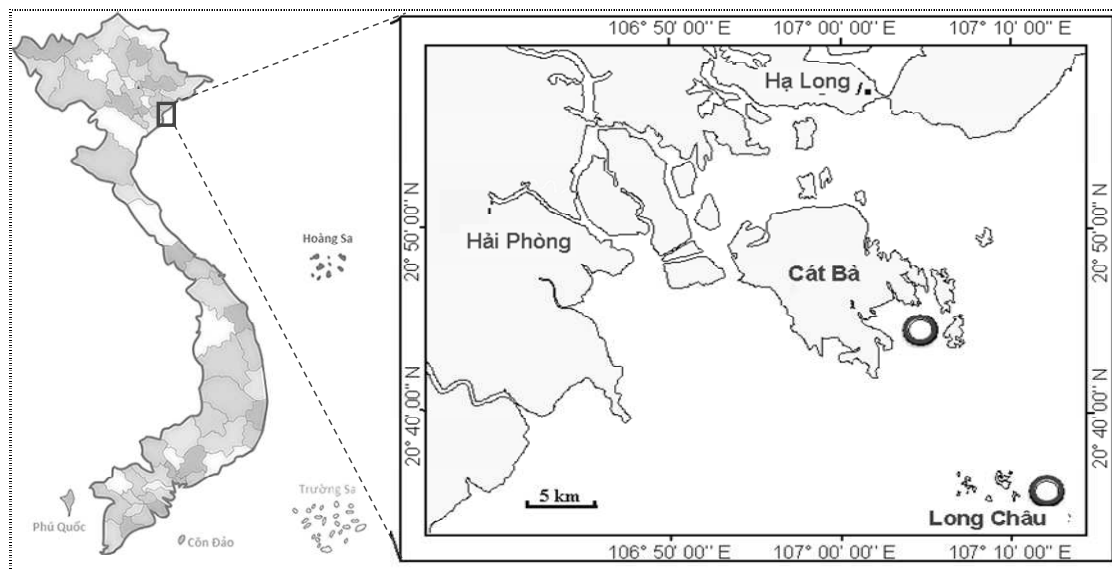
Phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm

Định lượng vi rút và vi khuẩn tổng số theo phương pháp của Leruste et al. (2012) [13]. Tỷ lệ vi khuẩn hoạt động hô hấp được xác định bằng phương pháp nhộm 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium clorua (CTC, tebu-bio SAS; 5 mM) và nuôi 30 phút, sau đó mẫu được cố định bằng formalin, bảo quản lạnh và xác định bằng máy đo dòng tế bào (Flow Cytometry) theo phương pháp của Marine (2013) [15]. Khả năng hấp thụ chất hữu cơ của vi khuẩn được thí nghiệm trên

đĩa sinh thái Biolog Ecoplate theo phương pháp của Christian & Lind (2006) [7], trung bình sự phát triển màu (AWCD) được xác định theo công thức: $AWCD_{(t)} = [\Sigma(C_{(t)} - R_{(t)})] / 31$, trong đó, t là thời gian nuôi, C là trung bình màu của mỗi cơ chất tại thời gian t; R là giá trị của giếng đối chứng. Sự đa dạng di truyền quần xã vi khuẩn được xác định bởi phương pháp điện di biến tính (DGGE) [15, 17].

Phương pháp xử lý số liệu

ANOVA một yếu tố được sử dụng để xác định sự khác nhau giữa các yếu tố nghiên cứu ($p < 0,05$). Tương quan giữa các yếu tố được xác định bởi hệ số tương quan Pearson qua phần mềm thống kê Xlstat 2010. Số liệu được cập nhật, tính toán và xây dựng đồ thị trên phần mềm Microsoft Excel.



Hình 1. Sơ đồ khu vực thu mẫu tại đảo Cát Bà và Long Châu, Việt Nam

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mật độ vi rút và vi khuẩn tổng số trong dịch nhầy san hô

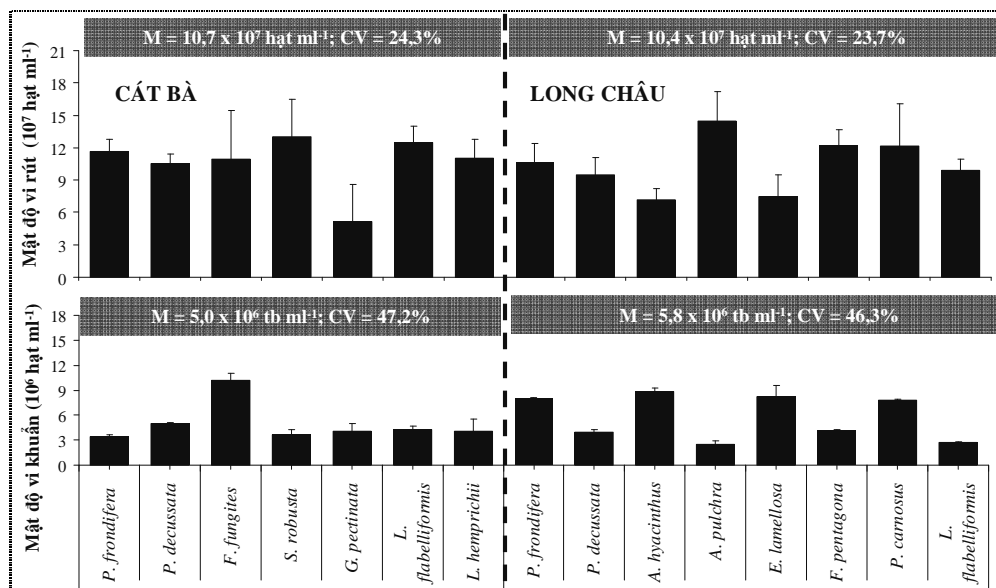
Từ kết quả trên hình 2 cho thấy, mật độ vi rút trong chất nhầy san hô khu vực nghiên cứu dao động từ $5,1 \times 10^7$ (*G. pectinata* ở Cát Bà) đến $14,5 \times 10^7$ hạt/ml (*A. pulchra* ở Long Châu), trung bình đạt $10,6 \pm 2,0 \times 10^7$ hạt/ml. Không có sự biến động lớn của mật độ vi rút trong dịch

nhầy giữa các loài san hô khác nhau trong khu vực nghiên cứu (CV=24,3% tại Cát Bà và 23,7% tại Long Châu).

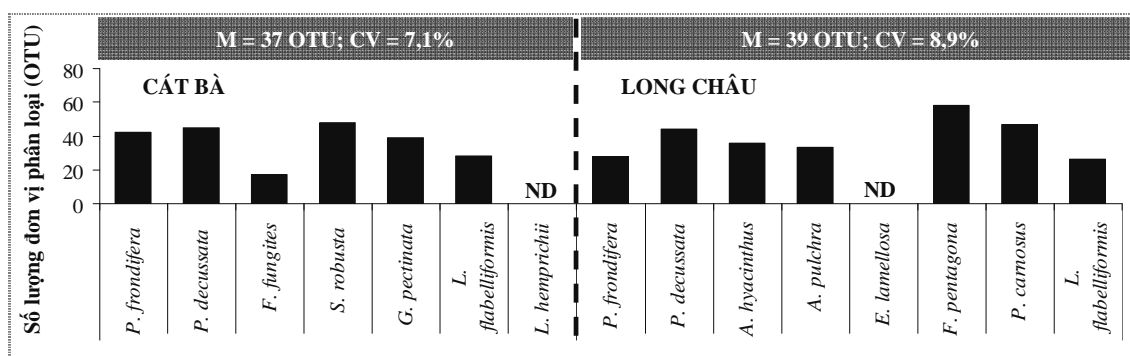
Đối với vi khuẩn, tính chung cho cả khu vực nghiên cứu, mật độ dao động từ $2,5 \times 10^6$ (*A. pulchra* ở Long Châu) đến $10,2 \times 10^6$ tế bào/ml (*F. fungites* ở Cát Bà), trung bình đạt $5,4 \pm 2,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Khác với vi rút, mật độ vi khuẩn có sự biến động lớn giữa các loài san

hồ trong khu vực nghiên cứu (CV=47,2% ở Cát Bà và 46,3% ở Long Châu). Hơn nữa, trong lớp dịch nhầy san hô khu

vực nghiên cứu có mật độ vi rút cao hơn mật độ vi khuẩn (~19 lần) (ANOVA một yếu tố, $p < 0,05$).



Hình 2. Mật độ vi rút và vi khuẩn tổng số trong dịch nhầy các loài san hô
M. mật độ trung bình; CV. hệ số biến động



Hình 3. Đơn vị phân loại di truyền của quần xã vi khuẩn trong dịch nhầy san hô
M. trung bình; CV. hệ số biến động; ND. không xác định

Số lượng đơn vị phân loại di truyền của quần xã vi khuẩn trong dịch nhầy san hô

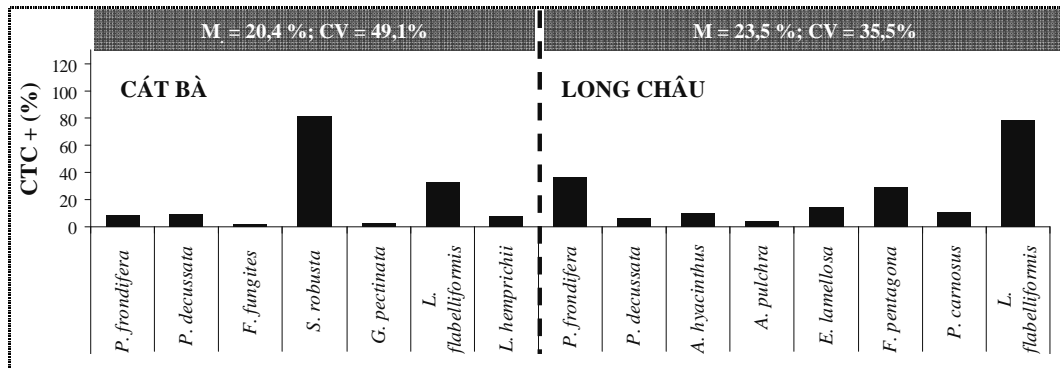
Kết quả phân tích đa dạng di truyền bởi phương pháp điện di biến tính (DGGE) trên hình 3 cho thấy, số lượng đơn vị phân loại di truyền (OTU) của quần xã vi khuẩn trong dịch nhầy của các loài san hô khu vực nghiên cứu giao động từ 17 OTU (*F. fungites* ở Cát Bà) đến 58 OTU (*F. pentagona* ở Long Châu), trung bình đạt 38 OTU. Số lượng đơn vị phân loại di

truyền trong dịch nhầy san hô không có sự biến động lớn giữa các loài san hô (CV=7,1% ở Cát Bà và 8,9% ở Long Châu).

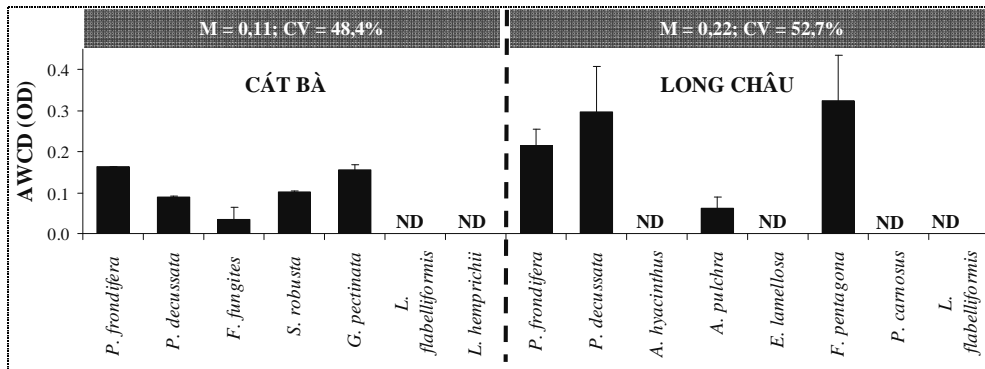
Tỷ lệ tế bào vi khuẩn có hoạt động hô hấp trong quần xã của dịch nhầy san hô

Từ kết quả trên hình 4 cho thấy, tỷ lệ tế bào vi khuẩn có hoạt động hô hấp (CTC+) trong quần xã của dịch nhầy san hô có sự giao động từ 1,84% (*F. fungites* ở Cát Bà) đến 81,13% (*S. robusta* ở Cát Bà), trung bình đạt 22,05%

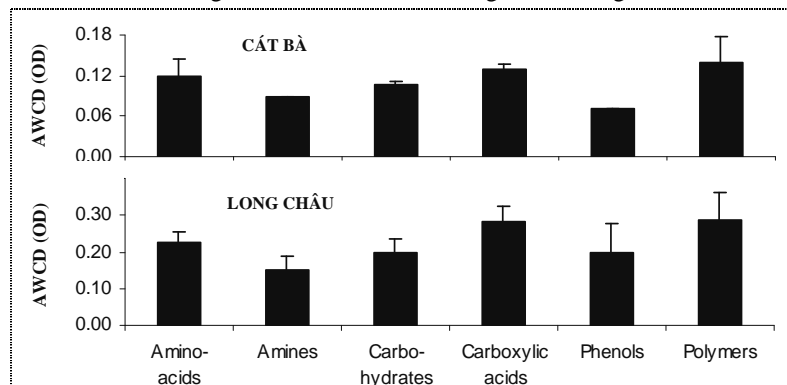
(trong đó, ở Cát Bà đạt 20,4% và ở Long Châu đạt 23,5%). Đặc biệt, tỷ lệ này có sự dao động rất lớn giữa các loài san hô (CV=49,1% ở Cát Bà và 35,5% ở Long Châu).



Hình 4. Tỷ lệ tế bào vi khuẩn có hoạt động hô hấp (CTC+) trong dịch nhầy san hô
M. trung bình; CV. hệ số biến động



Hình 5. Khả năng hấp thụ chất hữu cơ (AWCD) của quần xã vi khuẩn trong dịch nhầy của các loài san hô
M. trung bình; CV. hệ số biến động; ND. không xác định



Hình 6. AWCD của quần xã vi khuẩn trong dịch nhầy san hô

Khả năng hấp thụ chất hữu cơ của quần xã vi khuẩn trong dịch nhầy san hô

Hình 5 cho thấy, quần xã vi khuẩn trong

lớp chất nhầy của tất cả các loài san hô vùng nghiên cứu đều có khả năng sử dụng chất hữu cơ được thí nghiệm. Khả năng sử dụng chất hữu

cơ của vi khuẩn có sự biến động lớn giữa các loài san hô, với chỉ số CV=48,4% ở Cát Bà và 52,7% ở Long Châu. Trong 6 nhóm chất hữu cơ thí nghiệm, phenol và amine là hai nhóm ít

được sử dụng nhất, còn polymer, carboxylic-acid và amino-acid là những nhóm chất hữu cơ được sử dụng nhiều nhất (hình 6).

Bảng 1. Hệ số tương quan (R) giữa mật độ vi rút và các đặc điểm của quần xã vi khuẩn trong dịch nhầy san hô khu vực nghiên cứu

Đặc điểm	[BAC]	[VIR]	VBR	CTC +	OTUs	AWCD
[BAC]	1					
[VIR]	0,500	1				
VBR	0,049	-0,129	1			
CTC +	-0,401	-0,611	0,187	1		
OTU	0,169	0,187	-0,133	-0,498	1	
AWCD	-0,690	-0,522	-0,305	0,136	0,058	1

Các giá trị in đậm thể hiện sự tương quan với $p < 0,05$; [BAC] là mật độ vi khuẩn tổng số, [VIR] là mật độ vi rút tổng số; VBR là tỷ lệ vi rút/vi khuẩn; CTC+ là tỉ lệ vi khuẩn có hoạt động hô hấp trong quần xã; OUT là đơn vị phân loại; AWCD là khả năng hấp thụ chất hữu cơ của quần xã vi khuẩn.

Mối tương quan giữa vi rút và vi khuẩn trong môi trường dịch nhầy san hô

Kết quả nghiên cứu cho thấy, có sự tương quan thuận ($p < 0,05$) giữa mật độ vi rút và vi khuẩn tổng số sống trong lớp chất nhầy san hô ($R=0,500$; $p=0,041$) (bảng 1). Do đó, trong môi trường chất nhầy san hô, mật độ vi rút có vai trò trong việc kiểm soát mật độ vi khuẩn. Mặt khác, trong môi trường nước, bên cạnh lượng dinh dưỡng, hai yếu tố sinh học chính kiểm soát số lượng vi khuẩn là sinh vật ăn chúng (chủ yếu là tảo roi dị dưỡng - nanoflagellates và động vật phù du - ciliates) [23] và quá trình sinh tan của vi rút [8]. Tuy nhiên, đối với vi khuẩn trên san hô, sự bắt mồi không phải là yếu tố quyết định tới mật độ vi khuẩn, vì ở đây vi tảo hai roi dị dưỡng thường không thể tồn tại trong lớp chất nhầy san hô [26]. Do đó, rõ ràng, quá trình sinh tan của vi rút là phương thức duy nhất cho cơ chế kiểm soát quần thể vi khuẩn trong holobiont san hô.

Mặt khác, kết quả bảng 1 còn cho thấy, vi rút còn có tương quan nghịch ($p < 0,05$) với đặc điểm hoạt động của quần xã vi khuẩn, trong đó đặc điểm về tỷ lệ vi khuẩn có hoạt động hô hấp (CTC+) có hệ số tương quan $R=-0,611$ ($p=0,009$), và đặc điểm hoạt động hấp thụ chất hữu cơ (AWCD) có hệ số tương quan $R=-0,522$ ($p=0,032$). Điều này cho thấy, vi rút không chỉ có vai trò trong kiểm soát số lượng tế bào vi

khẩn mà còn có vai trò trong hoạt động chức năng của vi khuẩn trong lớp chất nhầy san hô. Mặt khác, vi khuẩn trên san hô cũng đã được chứng minh là có hoạt tính cao và phong phú [20], đặc điểm này cũng phù hợp với kết quả thí nghiệm trong nghiên cứu này, tất cả các chất hữu cơ thí nghiệm đều được quần xã vi khuẩn hấp thụ và chuyển hóa (hình 6). Kết quả này một phần minh chứng cho đặc điểm của chất nhầy san hô, với thành phần cấu tạo là protein, chất béo và các polysaccharides [27], trong đó, carbohydrate chiếm tới 80% trong chất nhầy [1] và là cơ chất tạo năng lượng cao qua sự phân hủy của vi khuẩn [28]. Như vậy, chất nhầy san hô là môi trường sống thuận lợi, thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn và ngược lại, hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn lại cung cấp nguồn dinh dưỡng quan trọng cho đời sống của san hô, và góp phần vào chức năng trao đổi chất của san hô trong các hệ sinh thái biển.

Ngoài ra, sự phân bố và hoạt động của hệ vi khuẩn trong lớp chất nhầy san hô còn tạo ra một rào cản với các vi sinh vật ngoại lai xâm nhập, trong đó có vi khuẩn gây bệnh thông qua các cơ chế khác nhau, như cạnh tranh không gian, cạnh tranh dinh dưỡng, tiết các chất kháng sinh ngoại bào [9], góp phần tạo thành khả năng phòng vệ miễn dịch của lớp chất nhầy [2, 3].

Như vậy, mối tương quan qua lại giữa vi rút và vi khuẩn tạo thành sự ảnh hưởng lẫn nhau

trong việc kiểm soát số lượng, các hoạt động và chức năng của chúng trong môi trường chất nhầy san hô. Trong đó, chúng có vai trò quan trọng trong kiểm soát sự xuất hiện và phát triển của các vi sinh vật ngoại lai xâm nhập, trong đó có vi khuẩn gây bệnh trên san hô. Do đó, chúng có liên đới tới sức khỏe của san hô.

KẾT LUẬN

Từ các bằng chứng kết quả nghiên cứu và cơ sở khoa học đã được phân tích, có thể nhận định rằng, vi rút có vai trò quan trọng trong kiểm soát số lượng và hoạt động chức năng của vi khuẩn trong san hô, chi phối sự xuất hiện và phát triển của các vi khuẩn gây bệnh trên san hô.

Lời cảm ơn: Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được tài trợ từ đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số: VAST 03-07/11-12.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bansil R., Turner B. S., 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11: 164-170.
2. Barr J. J., Auro R., Furlan M., Whiteson K. L., Erb M. L., Pogliano J., Stotland A., Wolkowicz R., Cutting A. S., Doran K. S., Salamon P., Youle M., Rohwer F., 2013. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 10771-10776.
3. Barr J. J., Youle M., Rohwer F., 2013. Innate and acquired bacteriophage-mediated immunity. *Bacteriophage*, 3: e25857.
4. Baudoux A. C., Noordeloos A. A., Veldhuis M. J., Brussaard C. P., 2006. Virally induced mortality of *Phaeocystis globosa* during two spring blooms in temperate coastal waters. *Aquatic Microbial Ecology*, 44: 201-207.
5. Bettarel Y., Sime-Ngando T., Bouvy M., Arfi R., Amblard C., 2005. Low consumption of virus-sized particles by heterotrophic nanoflagellates in two lakes of the French Massif Central. *Aquatic Microbial Ecology*, 39: 205-209.
6. Bettarel Y., Thuy N. T., Huy T. Q., Hoang P. K., Bouvier T., 2013. Observation of virus-like particles in thin sections of the bleaching scleractinian coral *Acropora cytherea*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93: 909-912.
7. Christian B. W., Lind O. T., 2006. Key issues concerning Biolog use for aerobic and anaerobic freshwater bacterial community level physiological profiling. *International review of Hydrobiology*, 91: 257-268.
8. Fuhrman J. A., 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399: 541-548.
9. Garren M., Azam F., 2012. Corals shed bacteria as a potential mechanism of resilience to organic matter enrichment. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 6: 1159-1165.
10. Garren M., Azam F., 2010. New method for counting bacteria associated with coral mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6128-6133.
11. Hoegh-Guldberg O., Ortiz J. C., Dove S., 2011. The future of coral reefs. *Science*, 334: 1494-1495.
12. Lang A. S., Zhaxybayeva O., Beatty J. T., 2012. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 472-482.
13. Leruste A., Bouvier T., Bettarel Y., 2012. Enumerating viruses in coral mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 6377-6379.
14. Lesser M. P., Mazel C. H., Gorbunov M. Y., Falkowski P. G., 2004. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science*, 305: 997-1000.
15. Marine C., Thierry B., Olivier P., Emma R. N., Corinne B., Thu P.T., Jean-Pascal T., Thuoc C. V., Bettarel Y., 2013. Freshwater

- prokaryote and virus communities can adapt to a controlled increase in salinity through changes in their structure and interactions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 133: 58-66.
16. Middelboe M., Riemann L., Steward G. F., Hansen V., Nybroe O., 2003. Virus-induced transfer of organic carbon between marine bacteria in a model community. *Aquatic Microbial Ecology*, 33: 1-10.
 17. Muyzer G., Waal E. C., Uitterlinden A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient del electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
 18. Pandolfi J. M., Connolly S. R., Marshall D. J. and Cohen A. L., 2011. Projecting coral reef futures under global warming and ocean acidification. *Science*, 333:418-422.
 19. Pollock F. J., Morris P. J., Willis B. L., Bourne D. G., 2011. The urgent need for robust coral disease diagnostics. *PLOS Pathogens*, 7: e1002183.
 20. Rohwer F., Seguritan V., Azam F., Knowlton N., 2002. Diversity and distribution of coral associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 243: 1-10.
 21. Rohwer F., Thurber R. V., 2009. Viruses manipulate the marine environment. *Nature*, 459:207-212.
 22. Rosenberg E., Koren O., Reshef L., Efrony R. and Rosenberg I. Z., 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Review Microbiology*, 5: 355-362.
 23. Sanders R. W., Caron D. A., Berninger U. G., 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh water- an inter-ecosystem comparison. *Marine Ecology Progress Series*, 86: 1-14.
 24. Shnit-Orland M., Sivan A., Kushmaro A., 2012. Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the coral holobiont. *Microbial Ecology*, 64: 851-859.
 25. Soffer N., Brandt M. E., Correa A. M., Smith T. B., Thurber R. V., 2014. Potential role of viruses in white plague coral disease. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 8: 271-283.
 26. Sweet M., Bythell J., 2012. Ciliate and bacterial communities associated with White Syndrome and Brown Band Disease in reef-building corals. *Environmental Microbiology*, 14: 2184-2199.
 27. Tremblay P., Weinbauer M. G., Rottier C., Guérardel Y., Nozais C., Ferrier C., 2011. Mucus composition and bacterial communities associated with the tissue and skeleton of three scleractinian corals maintained under culture conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91: 649-657.
 28. Wild C., Naumann M., Niggel W., Haas A., 2010. Carbohydrate composition of mucus released by scleractinian warm- and cold-water reef corals. *Aquatic Biology*, 10: 41-45.

**CORRELATION BETWEEN VIRUSES AND BACTERIA
IN CORAL MUCUS AT CAT BA AND LONG CHAU AREAS, VIETNAM**

Pham The Thu

Institute of Marine Environment and Resources, VAST

SUMMARY

Bacteria have an important role in the coral health, but is less studied. In order to clarify the question mentioned above, this paper is focusing on the correlation between the viral abundance and bacterial community characteristics (abundance, genetic diversity, activity) in the mucus of 12 coral species distribution in the Cat Ba and Long Chau areas, Hai Phong. The results showed that the viral abundance was positive correlation with bacterial abundance ($R=0.500$; $p=0.041$) and was negative correlation with the characteristics of respiration ($R=-0.611$; $p=0.009$), the organic matter absorption ($R=-0.522$; $p=0.032$) of microbial communities. Therefore, the role of viruses related to the coral health was shown by the role controlling bacterial abundance and activity of bacterial communities living on coral.

Keywords: Bacteria, coral, coral mucus, viruses.

Ngày nhận bài: 26-5-2014