

CHU KỲ SỐNG CỦA VIRUS TRÊN SAN HÔ Ở TRẠNG THÁI SỨC KHOẺ KHÁC NHAU TẠI HANG RÁI, NINH THUẬN, VIỆT NAM

Nguyễn Kim Hạnh*, Phạm Thị Miên, Đoàn Như Hải

Viện Hải dương học, VAST

TÓM TẮT: Virus sống cùng san hô có thể đóng vai trò quan trọng đến sức khỏe của san hô, tuy nhiên, nghiên cứu về virus trong san hô hiện còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, tổng số lượng và chu kỳ sống (tiềm tan và sinh tan) của virus sống cùng san hô được nghiên cứu và so sánh giữa các loài san hô và ở trạng thái sức khỏe khác nhau, cùng với vi khuẩn và tảo cộng sinh *Symbiodinium* được định lượng bằng kính hiển vi huỳnh quang. Kết quả cho thấy, khi san hô không bị tẩy trắng (KTT), số lượng virus tăng 1,2 lần và vi khuẩn giảm 1,73 lần so với san hô bị tẩy trắng (TT). Tảo cộng sinh *Symbiodinium* giảm đáng kể ở san hô TT, khoảng 5,6 lần so với ở san hô KTT. Một trong những kết quả quan trọng trong nghiên cứu này là xác định được sự tồn tại song song và hoạt động mạnh mẽ của virus ở cả 2 dạng tiềm tan và sinh tan trong san hô KTT so với san hô TT. Tỷ lệ vi khuẩn mang virus tiềm tan cao gấp 2 lần ở san hô KTT so với san hô TT. Số lượng virus phóng thích ra từ chu kỳ sinh tan ở san hô KTT cao gấp 3,5 lần so với con số này ở san hô TT. Như vậy, ở trạng thái khỏe mạnh, san hô là một môi trường thích hợp cho sự xâm nhiễm của virus ở cả 2 chu kỳ tiềm tan và sinh tan. Cả 2 chu kỳ này đều tiềm năng đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sức khỏe của san hô, trong đó chu kỳ tiềm tan có thể là phương thức xâm nhiễm mà vi khuẩn “có lợi” được bảo vệ khỏi sự bội nhiễm và chu kỳ sinh tan là phương thức diễn ra với các vi khuẩn gây bệnh cơ hội, giúp ngăn chặn sự xâm nhập của chúng vào san hô.

Từ khóa: *Symbiodinium*, san hô, tan, tiềm tan, tẩy trắng, vi khuẩn, virus.

MỞ ĐẦU

Tẩy trắng san hô là một hiện tượng phổ biến ở các vùng biển nhiệt đới và đã gây ra sự suy giảm lớn về độ phủ san hô trong những thập kỷ qua (De'ath et al., 2012; Hoegh-Guldberg, 2011). Sự kiện này thường xảy ra khi mối quan hệ cộng sinh giữa san hô và tảo cộng sinh bắt buộc của chúng (*Symbiodinium* hay zooxanthellae) bị phá vỡ. Hiện tượng tẩy trắng thường gây ra bởi áp lực môi trường, đặc biệt là nhiệt độ nước tăng cao bất thường (Brown, 1997; Glynn & D'croz, 1990; Jokiel & Brown, 2004), và ở mức độ ảnh hưởng ít hơn như: sự thay đổi của bức xạ mặt trời (Lesser et al., 1990), độ mặn (Coles & Jokiel, 1978), pH 0 axit hóa đại dương (Anthony et al., 2008), các chất gây ô nhiễm (Guzman et al., 1991) và sự phú dưỡng (Vega Thurber et al., 2009).

Gần đây, một số nghiên cứu đã chứng minh vi sinh vật có thể cũng tham gia vào sự tẩy trắng san hô, mặc dù diễn biến của các cơ chế vẫn còn chưa rõ ràng và còn nhiều tranh cãi (Rosenberg et al., 2007; Rosenberg et al., 2009). Hệ vi khuẩn sống cùng san hô được biết đã trải qua một thời gian dài chọn lọc và đồng tiến hóa với

vật chủ của chúng (Rosenberg et al., 2007). Những vi sinh vật này có vai trò cung cấp dinh dưỡng cho san hô (Kushmaro & Kramarsky-Winter, 2004; Rosenberg et al., 2009), một số trong đó tham gia vào cơ chế phòng vệ tự nhiên, chống lại các vi sinh vật gây bệnh thông qua khả năng sản sinh các hợp chất kháng khuẩn như peptides, thuốc kháng sinh (de Lima et al., 2012; Kvennefors et al., 2012; Rypien et al., 2010; Shnit-Orland et al., 2012) và sự cạnh tranh giữa các loài (Reis et al., 2009; Ritchie, 2006). Chính những vai trò quan trọng này mà bất kỳ sự thay đổi về sinh lý và/hoặc cấu trúc của quần xã vi sinh vật sống cùng san hô đều có thể ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe của san hô, thí dụ tạo cơ hội cho sự tiếp cận của vi sinh vật gây bệnh lên bề mặt của san hô. Điều này đã được nêu trong thuyết “Coral Probiotic” (Reshef et al., 2006; Rosenberg et al., 2007). Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cũng đã công bố kết quả về sự thay đổi đột ngột trong cấu trúc hệ vi khuẩn sống cùng san hô trong quá trình xảy ra hiện tượng tẩy trắng trong tự nhiên lần trong nghiên cứu thực nghiệm (Bourne et al., 2008; Lins-de-Barros, 2013; Littman et al.,

2011; Vega Thurber & Correa, 2011). Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào chứng minh được những thay đổi này là nguyên nhân hay là kết quả của hiện tượng tẩy trắng san hô và những thay đổi đó là do tác động của yếu tố sinh học hay phi sinh học.

Trong số các yếu tố sinh học có thể có khả năng tác động đến hệ vi khuẩn sống trong san hô, virus được xem là một yếu tố quan trọng nhất (Fuhrman, 1999; Suttle, 1992). Cho đến nay, virus được tìm thấy với số lượng lớn trong chất nhầy của san hô (Davy & Patten, 2007; Leruste et al., 2012; Nguyen-Kim et al., 2014) và chúng có khả năng tấn công cả vi khuẩn “có lợi” lẫn vi khuẩn gây bệnh trong san hô (Barr et al., 2013; Bettarel et al., 2014; van Oppen et al., 2009; Vega Thurber et al., 2014). Bằng khả năng linh hoạt trong việc phối hợp hai hình thức xâm nhiễm: sinh tan và tiêu tan, virus được giả thuyết rằng có thể một mặt bảo vệ san hô từ sự tấn công của vi khuẩn gây bệnh và bội nhiễm từ virus khác, hoặc ngược lại, virus có thể làm tăng tốc độ làm suy yếu sức khỏe của san hô, nhất là trong điều kiện môi trường không thích hợp (như tăng nhiệt độ nước) (Bettarel et al., 2014). Tuy nhiên, hiện nay chưa đủ dẫn chứng cụ thể để chứng minh các giả thuyết này. Còn ít dữ liệu về sự tồn tại của virus trong san hô tẩy trắng (bị bệnh do vi khuẩn gây ra) trong tự nhiên, chưa rõ mối tương tác giữa virus và vi khuẩn chủ của chúng, và lợi ích của tương tác này đến sức khỏe san hô.

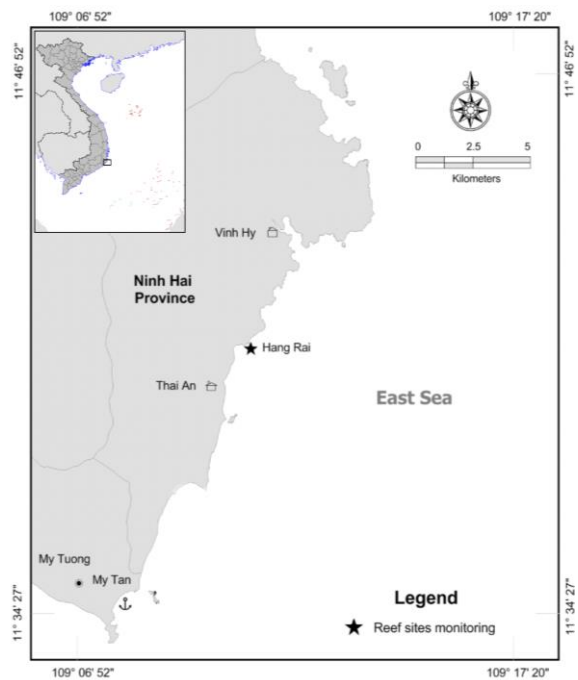
Để góp phần làm rõ mối quan hệ tương tác giữa virus và vi khuẩn chủ sống cùng san hô trong quá trình tẩy trắng san hô, nghiên cứu này khảo sát thành phần vi sinh vật, đặc biệt là hình thức xâm nhiễm của virus, trong các loài san hô khỏe mạnh và bị tẩy trắng tại Hang Rái, Ninh Thuận.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Địa điểm, đối tượng nghiên cứu và phương pháp xử lý mẫu

Hang Rái (109°18'28.1" kinh độ đông, 11°67'71.7" vĩ độ bắc) thuộc vịnh Vĩnh Hy, tỉnh Ninh Thuận được lựa chọn là địa điểm thu mẫu trong nghiên cứu này (hình 1). Nhiệt độ nước biển tại thời điểm thu mẫu là 30,5°C, độ mặn 34,3‰. Ba loài san hô cành *Acropora hyacinthus*

(AH), *Acropora muricata* (AM) và *Acropora robusta* (AR) được lựa chọn là đối tượng nghiên cứu. Mẫu san hô được thu bởi các thợ lặn có khí tài (SCUBA) ở độ sâu 3–5 m. Ở mỗi loài, thu 3 cành san hô, dài 10–15 cm, từ 1 tập đoàn san hô không có dấu hiệu tẩy trắng (KTT) và 3 cành từ tập đoàn bị tẩy trắng (TT). Mẫu sau khi thu được giữ trong ống falcon đã khử trùng có chứa nước biển và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Mẫu san hô sau khi lấy về, cân 2 g mỗi mẫu, nghiền, pha loãng với 18 ml nước biển lọc vô trùng qua màng lọc ANODISC 0,02 µm (Whatman) và đồng nhất bằng máy vortex.



Hình 1. Địa điểm thu mẫu (đánh dấu sao) ở Hang Rái, Ninh Thuận

Phương pháp đếm tổng số tảo *Symbiodinium*, vi khuẩn và virus

Mẫu san hô dùng để đếm số lượng vi khuẩn và virus được cố định với formaldehyde 37% (nồng độ cuối là 3%), làm lạnh nhanh bằng ni tơ lỏng và bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi tiến hành phân tích. Trước khi đếm, mẫu san hô được xử lý với dung dịch potassium citrate để tách các tế bào tảo, vi khuẩn và virus (Leruste et al., 2012). Tổng số tảo, vi khuẩn và virus được lọc trên màng ANODISC 0,02 µm, sau đó nhuộm bằng SYBR Gold (Invitrogen) và đếm bằng kính hiển vi huỳnh quang Olympus Provis AX70 (Patel et al., 2007).

Phương pháp xác định virus ở dạng tiềm tan

Trong nghiên cứu này, tỉ lệ tế bào vi khuẩn mang virus ở dạng tiềm tan trong san hô lần đầu tiên được xác định bằng phương pháp chiếu đèn UV. Tia UV được dùng để kích hoạt các virus ở dạng tiềm tan chuyển sang dạng sinh tan. Phương pháp này được cải biến áp dụng cho nghiên cứu virus ở dạng tiềm tan trong san hô dựa theo Weinbauer & Suttle (1999). Mẫu san hô sau khi xử lý được ủ tối dưới đèn UV trong vòng 17 giờ. Các mẫu đối chứng ủ ở nhiệt độ phòng, trong tối cũng được tiến hành song song. Mẫu sau khi ủ được cố định bằng dung dịch formaldehyde 37% đến nồng độ cuối cùng là 3%, làm lạnh nhanh với ni tơ lỏng và bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi phân tích. Số lượng virus trong các mẫu ủ UV và đối chứng được đếm bằng kính hiển vi huỳnh quang kết hợp với phương pháp nhuộm SYBR Gold. Tỉ lệ vi khuẩn mang virus ở dạng tiềm tan (FLC) được tính theo công thức sau: $\text{FLC}(\%) = 100 \times (\text{V}_m - \text{V}_c) / \text{BS} \times \text{BA}_{10}$, trong đó V_m là số virus trong mẫu ủ UV, V_c số virus trong mẫu đối chứng, BS là hệ số nhân virus hay burst size (số lượng virus được phóng ra từ 1 tế bào vi khuẩn, ở san hô trung bình là 24) và BA_{10} là số lượng vi khuẩn trong mẫu ban đầu, trước khi chiếu đèn UV.

Phương pháp xác định virus sản sinh từ chu kỳ sinh tan

Chất độc kali cyanua (KCN) có thể ức chế quá trình sản sinh virus trong chu kỳ sinh tan của mỗi mẫu san hô và được sử dụng để tính tổng số virus được sản sinh qua chu kỳ sinh tan (Heldal & Bratbak, 1991; Suttle & Feng, 1992). Các mẫu san hô được bổ sung KCN đến nồng độ cuối là 2 mM và ủ ở nhiệt độ phòng trong 17 giờ. Quá trình ủ được kết thúc bằng việc bổ sung formaldehyde 37% (nồng độ cuối cùng 3%). Số lượng virus được xác định trong mẫu có và không có bổ sung KCN được đếm bằng kính hiển vi huỳnh quang bằng cách sử dụng SYBR Gold. Sự sai khác giữa số lượng virus trong mẫu có và không có KCN (mẫu đối chứng) cho phép ước lượng của số lượng virus sản xuất trong chu kỳ sinh tan (gọi tắt là VP).

Phương pháp phân tích thống kê

Phần mềm Excel, R 2.1 được sử dụng để tính toán và chạy các phép kiểm định thống kê. Phép thử t-test được sử dụng để kiểm định sự

sai khác giữa các thông số nghiên cứu. Kết quả $p < 0,05$ được cho là có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tổng số lượng tảo *Symbiodinium*, vi khuẩn và virus

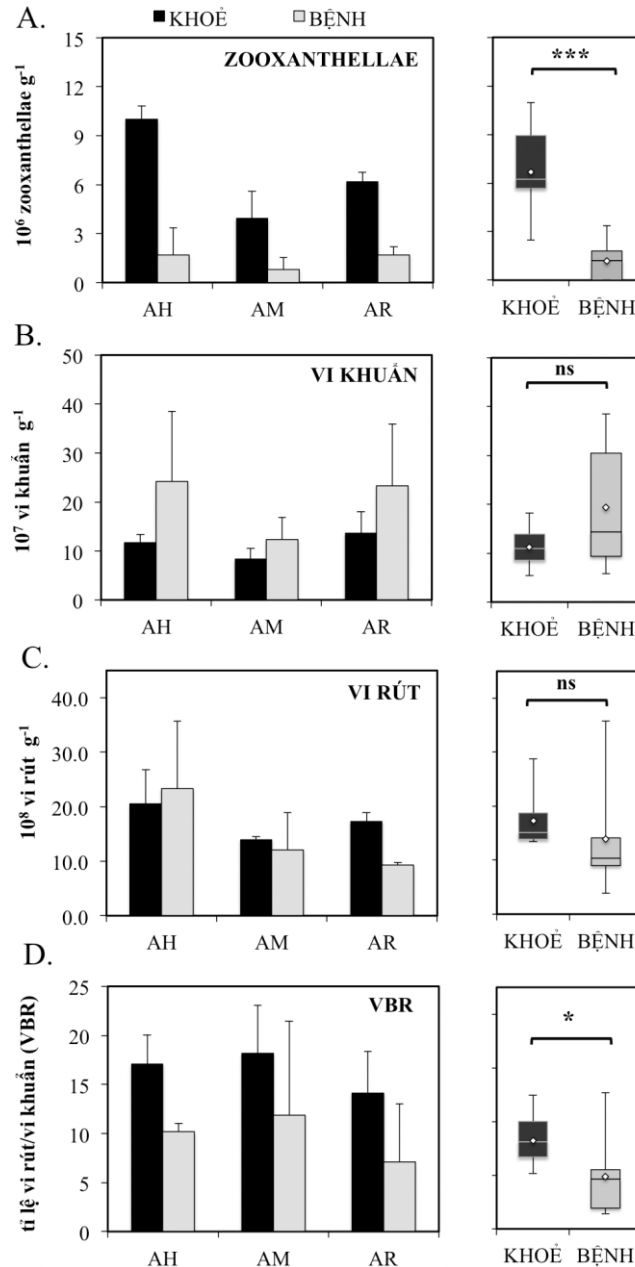
Số lượng tảo *Symbiodinium*, trên trung bình, ở san hô KTT ($\text{TB} = 6,7 \pm 2,7 \times 10^6$ tế bào ($\text{TB} \text{ g}^{-1}$) cao gấp 5,6 lần so với mẫu tẩy trắng ($\text{TB} = 1,2 \pm 1,1 \times 10^6$ tế bào g^{-1}) (hình 2a). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (Wilcoxon, $p < 0,01$; $n = 9$). Xét từng loài san hô, số lượng này ở mỗi cặp san hô với tình trạng sức khỏe khác nhau đều cho thấy sự khác nhau về mặt thống kê. Trong đó, san hô AH không tẩy trắng có tổng số tế bào *Symbiodinium* lớn nhất trong các loài san hô ($10 \pm 0,8 \times 10^6 \text{ TB g}^{-1}$), cao gấp 6 lần so với AH bị tẩy trắng ($1,7 \pm 1,6 \times 10^6 \text{ TB g}^{-1}$) (Wilcoxon, $p < 0,05$; $n = 3$). San hô AM không tẩy trắng có $3,9 \pm 1,7 \times 10^6 \text{ Symbiodinium g}^{-1}$, nhiều hơn gần 5 lần so với san hô AM tẩy trắng ($0,8 \pm 0,7 \times 10^6 \text{ TB g}^{-1}$) (Wilcoxon, $p < 0,05$; $n = 3$). San hô AR không tẩy trắng chứa $6,2 \pm 0,6 \times 10^6 \text{ TB g}^{-1}$, cao gấp khoảng 4 lần so với AR tẩy trắng ($1,7 \pm 0,5 \times 10^6 \text{ TB g}^{-1}$) (Wilcoxon, $p < 0,05$; $n = 3$).

Số lượng vi khuẩn trung bình ở san hô KTT là $11,2 \pm 3,8 \times 10^7 \text{ TB g}^{-1}$, thấp hơn 1,73 lần so với con số này ở san hô tẩy trắng ($19,4 \pm 12,3 \times 10^7 \text{ TB g}^{-1}$) (hình 2b), tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê. Cụ thể, khi so sánh từng cặp san hô với tình trạng sức khỏe khác nhau ở 3 loài san hô, cho thấy số lượng lần lượt là $12 \pm 0,2$; $8,3 \pm 2,3$; $13,6 \pm 4,5 \times 10^7 \text{ TB g}^{-1}$ ở san hô AH, AM và AR không tẩy trắng, thấp hơn 2,1; 1,5 và 1,7 so với các san hô tương ứng AH, AM và AR bị tẩy trắng.

Cũng giống như số lượng tảo và vi khuẩn, số lượng virus có sự dao động ở cả 2 nhóm san hô KTT và TT. Trên trung bình, số lượng này cao hơn ở san hô KTT ($17,3 \pm 1,6 \times 10^8$ virus g^{-1}) so với san hô TT ($13,9 \pm 9,4 \times 10^8$ virus g^{-1}) (hình 2c). Sự sai khác này không có ý nghĩa về mặt thống kê. Xét từng cặp, chỉ duy nhất ở san hô AR cho thấy sự gia tăng virus có ý nghĩa thống kê ở san hô KTT ($17,3 \pm 4,5 \times 10^8$ virus g^{-1}) so với san hô TT ($9,3 \pm 0,5 \times 10^8$ virus g^{-1}) (Wilcoxon, $p < 0,05$; $n = 3$). Ở 2 loài còn lại, AH và AM không tẩy trắng không cho thấy sự khác biệt ở số lượng virus về mặt thống kê so với san hô tẩy trắng cùng loài.

Từ số lượng vi khuẩn và virus phân tích được, tỉ lệ virus/vi khuẩn (VBR) cũng được xác định. Tỉ lệ này đạt 16,5 ở san hô KTT, cao hơn gấp 1,7 lần so với san hô bị TT (9,7) (Wilcoxon, $P < 0,01$, $n = 9$) (hình 2d). San hô AH không tẩy

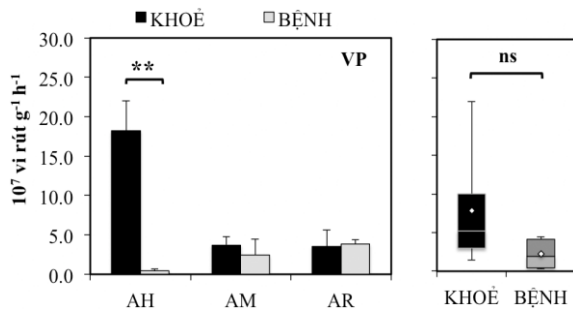
trắng (VBR = 17 ± 3) có tỉ lệ VBR cao gấp 1,7 lần với AH tẩy trắng (VBR = $10 \pm 0,8$). San hô AM và AR không tẩy trắng lần lượt có số VBR là $18 \pm 4,9$ và $14 \pm 4,2$, cao gấp 1,5 và 2 lần so với AM ($12 \pm 9,6$) và AR ($7 \pm 5,9$) tẩy trắng.



Hình 2. Số lượng *Symbiodium* (A), vi khuẩn (B), vi rút (C) và tỉ lệ vi rút/vi khuẩn (VBR) (D) ở 3 loài san hô *Acropora hyacinthus* (AH), *Acropora muricata* (AM) và *Acropora robusta* (AR). Đồ thị cột biểu diễn số liệu trung bình với độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các đồ thị hộp bên phải là biểu diễn số liệu trung bình của các chỉ số tương ứng so sánh giữa san hô không (KHOẼ) và có dấu hiệu bệnh (BỆNH) ($n = 9$). Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu được biểu diễn bằng dấu ngoặc vuông (t-test, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, ns: không ý nghĩa)

Tổng virus sản sinh từ chu kỳ sinh tan

Trung bình, san hô KTT cho kết quả số lượng virus sản xuất từ chu kỳ tan (VP) là $7,8 \pm 7,0 \times 10^7$ virus $g^{-1} h^{-1}$ và TT là $2,2 \pm 1,8 \times 10^7$ virus $g^{-1} h^{-1}$ (hình 3). Sự khác biệt này là 3,5 lần, tuy nhiên không có ý nghĩa về mặt thống kê. Chỉ số này được tìm thấy cao nhất ở san hô AH không tẩy trắng ($18,1 \pm 3,8 \times 10^7$ virus $g^{-1} h^{-1}$). Số lượng này cao gấp hơn 38 lần số virus trong cùng san hô AH tẩy trắng ($0,48 \pm 0,02 \times 10^7$ virus $g^{-1} h^{-1}$). Sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê (Wilcoxon, $p < 0,01$; $n = 3$). Ở 2 loài san hô AM và AR, số lượng này không chênh lệch nhiều ở cả 2 trạng thái sức khỏe khác nhau. Trong đó, san hô không tẩy trắng AM và AR có lần lượt là $3,7 \pm 1,0 \times 10^7$ và $3,5 \pm 2,1 \times 10^7$ virus được sản xuất ra trên 1 g san hô trong 1 giờ. AM và AR tẩy trắng sản xuất lần lượt là $2,4 \pm 2,0 \times 10^7$ và $3,9 \pm 0,6 \times 10^7$ virus $g^{-1} h^{-1}$.

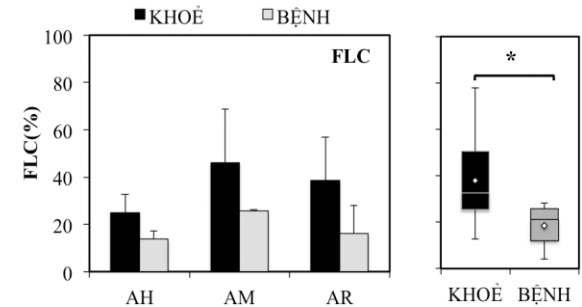


Hình 3. Số lượng vi rút sinh mới từ chu kỳ tan (VP) ở 3 loài san hô *Acropora hyacinthus* (AH), *Acropora muricata* (AM) và *Acropora robusta* (AR). Đồ thị cột biểu diễn số liệu trung bình với độ lệch chuẩn ($n = 3$). Đồ thị hộp bên phải là biểu diễn số liệu trung bình của các chỉ số tương ứng so sánh giữa san hô không (KHOE) và có dấu hiệu bệnh (BỆNH) ($n = 9$). Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu được biểu diễn bằng dấu ngoặc vuông (t-test, $*p < 0,05$; $***p < 0,001$, ns: không ý nghĩa)

Tỉ lệ vi khuẩn mang virus tiềm tan

Trung bình, tỉ lệ FLC ($38 \pm 19,9\%$) ở san hô KTT cao hơn gấp 2 lần so với san hô TT ($18,5 \pm 8,9\%$) (hình 4). Sự sai khác này có ý nghĩa về mặt thống kê (Wilcoxon, $p < 0,05$; $n = 9$). Tỉ lệ này được phát hiện cao nhất ở san hô AM không tẩy trắng ($46,2 \pm 22,4\%$), lớn hơn 1,8 lần so với cùng loài san hô nhưng có dấu hiệu tẩy trắng ($25,6 \pm 0,5\%$). Theo sau là AR có $38,5 \pm$

$18,3\%$ và $16,1 \pm 12 \%$ vi khuẩn mang virus tiềm tan lần lượt ở san hô KTT và TT. Cuối cùng là $25 \pm 7,8\%$ ở AM không tẩy trắng và $13,8 \pm 3,4\%$ AM tẩy trắng.



Hình 4. Tỉ lệ vi khuẩn mang vi rút tiềm tan (FLC) ở 3 loài san hô *Acropora hyacinthus* (AH), *Acropora muricata* (AM) và *Acropora robusta* (AR). Đồ thị cột biểu diễn số liệu trung bình với độ lệch chuẩn ($n = 3$). Đồ thị hộp bên phải là biểu diễn số liệu trung bình của các chỉ số tương ứng so sánh giữa san hô không (KHOE) và có dấu hiệu bệnh (BỆNH) ($n = 9$). Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu được biểu diễn bằng dấu ngoặc vuông (t-test, $*p < 0,05$; $***p < 0,001$, ns: không ý nghĩa).

THẢO LUẬN

Hiện tượng tẩy trắng san hô được biết đến khi xảy ra các loài tảo cộng sinh *Symbiodinium* bị tách khỏi mô của san hô dưới tác động của biến đổi môi trường, đặc biệt là sự tăng nhanh nhiệt độ nước biển trong một thời gian dài (Brown, 1997; Harvell et al., 2007). Trong nghiên cứu này, cả ba loài san hô bị tẩy trắng AH, AM và AR đều cho thấy số lượng *Symbiodinium* giảm đáng kể (khoảng 5,6 lần) so với những san hô không có dấu hiệu tẩy trắng (hình 2a). Điều này một phần khẳng định mối liên hệ cộng sinh giữa tảo *Symbiodinium* và san hô vật chủ bị phá vỡ khi san hô bị tẩy trắng. Kết quả cuối cùng có thể san hô bị chết.

Bên cạnh sự thay đổi của số lượng tảo cộng sinh, tổng số lượng vi khuẩn và virus cũng được phân tích và so sánh giữa san hô KTT và san hô TT. Trong đó, số lượng tổng vi khuẩn được ước lượng thấp hơn không đáng kể (1,73 lần) ở san hô KTT so với TT. Nhưng điều này không khẳng định rằng không có sự khác biệt của hệ vi khuẩn sống cùng san hô khi san hô thay đổi tình

trạng sức khoẻ vì đây chỉ là một kết quả mang tính chất định lượng tổng số. Cần có những phân tích bổ sung để có thể cho thấy sự khác nhau rõ rệt hơn liên quan đến thành phần loài và cấu trúc hệ vi khuẩn khi san hô thay đổi tình trạng sức khoẻ. Các nghiên cứu trước đây ở cả ngoài tự nhiên lẫn trong phòng thí nghiệm đã khẳng định, khi san hô bị tẩy trắng, thành phần loài/cấu trúc hệ vi khuẩn sống cùng san hô bị thay đổi hoàn toàn (Bourne et al., 2008; Linsde-Barros et al., 2013; Littman et al., 2011; Vega Thurber & Correa, 2011). Tuy vậy, cho đến nay, ngoài những dẫn liệu kể trên vẫn chưa cho có một nghiên cứu nào xác định rõ liệu những thay đổi (về thành phần vi sinh vật) này là nguyên nhân hay kết quả của quá trình tẩy trắng và liệu những thay đổi này là do tác động của các yếu tố sinh học hay phi sinh học.

Như đã nói trong phần giới thiệu, virus là một trong những yếu tố sinh học tiềm năng nhất có ảnh hưởng lớn đến sự biến động cấu trúc hệ vi khuẩn thông qua hai hình thức xâm nhiễm đặc trưng của chúng: sinh tan và tiềm tan. Virus trong san hô ở các nghiên cứu trước được tìm thấy với số lượng rất lớn (Leruste et al., 2012; Nguyen-Kim et al., 2014), có khả năng xâm nhiễm tất cả các sinh vật trong holobiont san hô (Davy & Patten, 2007), trong đó, phần lớn là virus xâm nhiễm vi khuẩn (bacteriophage) (Nguyen-Kim et al., 2015a). Trong nghiên cứu của chúng tôi, virus trong các loài san hô ở tình trạng khỏe mạnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với khi san hô ở trạng thái tẩy trắng (hình 2c). Đây có thể là kết quả của quá trình sinh tan mạnh mẽ hơn của virus đối với vi khuẩn vật chủ sống cùng san hô KTT. Quá trình sinh tan này có thể đã làm giảm số lượng vi khuẩn và tăng số lượng virus ở san hô KTT, dẫn đến sự gia tăng tỉ lệ VBR như đã được xác định trong nghiên cứu này (hình 2d). Trong một nghiên cứu trước đây, tỉ lệ VBR cao thường được cho rằng tương quan với sự phát triển mạnh mẽ hơn của quá trình sinh tan, với kết quả là sự gia tăng số lượng tổng virus (Maurice et al., 2010).

Thực tế trong nghiên cứu này, số lượng virus sản sinh từ chu kỳ sinh tan cũng được ước lượng cao hơn ở san hô KTT, đặc biệt ở loài san hô AH, so với san hô có dấu hiệu tẩy trắng (hình 3). Gần đây, Barr et al., (2013a,b) đã đưa ra một mô hình giả thuyết về sự liên kết chặt chẽ về mặt hoá học giữa protein Ig-like của virus với nhóm protein mucin của màng nhầy ở

san hô. Sự liên kết này vô hình chung lập thành một hàng rào bảo vệ san hô từ sự xâm nhập của các vi khuẩn cơ hội (gây bệnh hoặc không) thông qua sự xâm nhiễm ở kỳ sinh tan của virus. Mô hình này cho thấy hình thức xâm nhiễm tan của virus có thể đóng một vai trò rất quan trọng đối với san hô trong việc bảo vệ chúng trước sự thâm nhập của các vi khuẩn gây bệnh cơ hội. Trong nghiên cứu này, số lượng virus sản sinh trong kỳ sinh tan tăng lên ở san hô KTT có thể là kết quả của hoạt động xâm nhiễm tan đối với các tế bào vi khuẩn cơ hội (gây bệnh hoặc không) của virus nhằm ngăn chặn sự tấn công của những vi khuẩn “gây hại” này vào cơ thể của san hô. Từ đó, số lượng vi khuẩn có thể giảm và ngược lại số lượng virus tăng lên, và hiện nhiên dẫn đến sự tăng lên có ý nghĩa thống kê của tỉ lệ VBR ở san hô KTT so với san hô có dấu hiệu tẩy trắng. Vấn đề đặt ra ở đây là liệu ngoài hình thức sinh tan, virus còn có thể sử dụng hình thức tiềm tan như thế nào và có hay không sự tương quan của 2 hình thức này đến sức khoẻ của san hô.

Hình thức tiềm tan được biết đến như một phương thức xâm nhiễm quan trọng của virus khi điều kiện môi trường không thuận lợi (như môi trường nước lạnh, nghèo dinh dưỡng) cho sự phát triển của vật chủ (như vi khuẩn) của chúng, dẫn đến không thuận lợi cho sự phân chia của bản thân virus. Trong nghiên cứu này, phương pháp chiếu đèn UV được sử dụng để xác định tỉ lệ vi khuẩn mang virus tiềm tan (FLC) trong san hô. Trước đó, kỹ thuật này đã được sử dụng rộng rãi đối với vi khuẩn trong môi trường nước (Jiang & Paul, 1996; Weinbauer & Suttle, 1999) nhưng đây là lần đầu tiên phương pháp này được áp dụng trong nghiên cứu FLC ở san hô. Phương pháp UV được sử dụng thay thế phương pháp dùng chất kháng sinh mitomycin-C trong một số nghiên cứu trước đây nhưng có thể chưa cho kết quả tối ưu (Nguyen-Kim et al., 2015a,b). Bên cạnh đó, đây cũng là nghiên cứu đầu tiên so sánh virus tiềm tan ở san hô với tình trạng sức khoẻ khác nhau thu ngoài tự nhiên. Trong nghiên cứu này, tất cả san hô KTT có tỉ lệ FLC cao gấp 2 lần so với những san hô tẩy trắng (hình 3.2). Tỉ lệ FLC của nghiên cứu này (dao động từ 12,0–77,8%) trong san hô cũng cao hơn so với tỉ lệ FLC trong các loài san hô khác nghiên cứu trước đó (1,1–25,4%) (Nguyen-Kim et al., 2015a). Đây là một kết quả mới và quan trọng, mở ra những

thảo luận mới về vai trò của virus tham gia pha tiềm tan trong sức khỏe san hô. Ở đây có thể đưa ra giả thuyết cho rằng phần lớn những vi khuẩn mang virus tiềm tan này có thể là vi khuẩn “có lợi” cho san hô. Ở trạng thái bị xâm nhiễm tiềm tan, những vi khuẩn này có thể tránh được sự bồi nhiễm hay sự xâm nhập của loài virus khác vào cơ thể chúng và tế bào vi khuẩn vẫn được bảo toàn. Chính vì thế, những vi khuẩn này vẫn có thể tiếp tục tiến hành những chức năng quan trọng của nó đối với san hô như cung cấp dinh dưỡng hoặc sinh chất kháng sinh. Lợi ích của hình thức tiềm tan đối với sức khỏe của san hô có thể được virus ứng dụng trong điều kiện môi trường ổn định. Tuy nhiên, hình thức này sau đó có thể bị kích hoạt khi có một hay nhiều thay đổi một cách đột ngột trong môi trường sống của san hô (như tăng nhiệt độ, thay đổi độ mặn nước biển, ô nhiễm), hệ quả là virus tiềm tan chuyển qua pha sinh tan, phá vỡ tế bào vi khuẩn vật chủ “có lợi” và cuối cùng là sự suy yếu về mặt sức khỏe trong san hô. Giả thuyết này vẫn cần nhiều những nghiên cứu, khảo sát liên tục ở các rạn san hô và các biến động trong hệ vi sinh vật sống cùng tương quan với sự biến động lý hoá trong môi trường nước.

KẾT LUẬN

Virus tồn tại và hoạt động rất mạnh song song cả hai chu kỳ tiềm tan và sinh tan trong san hô không bị tẩy trắng so với san hô bị tẩy trắng.

Sự tồn tại song song và khả năng lựa chọn linh hoạt phương thức xâm nhiễm (tiềm tan, sinh tan) của virus đối với vi khuẩn vật chủ có tiềm năng đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sức khỏe san hô.

Cần tiếp tục có những nghiên cứu sâu hơn để đưa ra các số liệu và bằng chứng cụ thể nhằm xác định rõ vai trò quan trọng của virus trong sức khỏe san hô.

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện từ nguồn kinh phí tài trợ của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) qua đề tài trẻ 2016 của tác giả Nguyễn Kim Hạnh và một phần kết quả từ đề tài cơ sở 2016 của tác giả Phạm Thị Miên. Cảm ơn đề tài VAST06.02/16-17 đã hỗ trợ một phần kinh phí trong quá trình thu mẫu. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn ông Phan Kim Hoàng và Nguyễn Minh Hiếu đã giúp đỡ trong việc thu và định loại mẫu san hô tại Hang Rái, tỉnh Ninh Thuận.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anthony K. R. N., Kline D. I., Diaz-Pulido G., Dove S., and Hoegh-Guldberg O. (2008). Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 17442–7446.
- 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 of the United States of America*, 110: 10771–10776.
- Barr J. J., Youle M., Rohwer F., 2013. Innate and acquired bacteriophage-mediated immunity. *Bacteriophage*, 3(3): Doi: 10.4161/bact.25857.
- Bettarel Y., Bouvier T., Nguyen-Kim H., Pham-The T., 2014. The versatile nature of coral associated viruses. *Environ Microbiol* Accepted.
- Bourne D., Iida Y., Uthicke S., Smith-Keune C., 2008. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *ISME Journal*, 2: 350–363.
- Brown B. E., 1997. Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* 16: S129-S1387.
- Coles S. L., Jokiel P. L. (1978). Synergistic effects of temperature, salinity and light on hermatypic coral *Montipora verrucosa*. *Marine Biology*, 49: 187–195.
- Davy J. E., Patten N. L., 2007. Morphological diversity of virus-like particles within the surface microlayer of scleractinian corals. *Aquatic Microbial Ecology*, 47: 37–44.
- de Lima L. A., Migliolo L., Barreiro e Castro C., Pires D. D., Lopez-Abarrategui C., Goncalves E. F., Vasconcelos I. M., de Oliveira J. T. A., Otero-Gonzalez A. D. J., Franco O. L., Dias S. C., 2013. Identification of a Novel Antimicrobial Peptide from Brazilian Coast Coral *Phyllogorgia dilatata*. *Protein and Peptide Letters*, 20:1153–1158.
- De'ath G., Fabricius K. E., Sweatman H., and Puotinen M., 2012. The 27-year decline of

- coral cover on the Great Barrier Reef and its causes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 17995–17999.
- Fuhrman J. A., 1999. Marine viruses: biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399: 541–548.
- Glynn P. W., Dcroz L., 1990. Experimental evidence for high temperature stress as the cause of El-Nino coincident coral mortality. *Coral Reefs*, 8: 181–191.
- Guzman H. M., Jackson J. B. C., and Weil E., 1991. Short term ecological consequences of a major oil spill on Panamanian subtidal reef corals. *Coral Reefs*, 10: 1–12.
- Harvell D., Jordan-Dahlgren E., Merkel S., Rosenberg E., Raymundo L., Smith G., Weil E., Willis B., 2007. Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography*, 20: 172–195.
- Heldal M. và Bratbak G. (1991). Production and decay of viruses in aquatic environments. *Mar Ecol Prog Ser*, 72: 205–212.
- Hoegh-Guldberg O., 2011. Coral reef ecosystems and anthropogenic climate change. *Regional Environmental Change*, 11: S215–S227.
- Jiang S. C., Paul J. H., 1996. Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 142: 27–38.
- Jokiel P. L. and Brown E. K., 2004. Global warming, regional trends and inshore environmental conditions influence coral bleaching in Hawaii. *Global Change Biology*, 10: 1627–1641.
- Kushmaro A., Kramarsky-Winter E., 2004. Bacteria as a source of coral nutrition. In: Rosenberg E, Loya Y (eds) *Coral health and disease*. Springer, Berlin, 231–242.
- Kvennefors E. C. E., 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: 605–618.
- Leruste A., Bouvier T., and Bettarel Y., 2012. Enumerating viruses in coral mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 6377–6379.
- Lesser M. P., Stochaj W. R., Tapley D. W., and Shick J. M., 1990. Bleaching in coral reef anthozoans: Effects of irradiance, ultraviolet radiation and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs*, 8: 225–232.
- Lins-de-Barros M. M., Cardoso A. M., Silveira C. B., Lima J. L., Clementino M. M., Martins O. B., Albano R. M., Vieira R. P., 2013. Microbial Community Compositional Shifts in Bleached Colonies of the Brazilian Reef-Building Coral *Siderastrea stellata*. *Microbial Ecology*, 65: 205–213.
- Littman R., Willis B. L., Bourne D. G., 2011. Metagenomic analysis of the coral holobiont during a natural bleaching event on the Great Barrier Reef. *Environmental Microbiology Reports*, 3: 651–660.
- Maurice C. F., Bouvier T., Comte J., Guillemette F., and del Giorgio P. A. (2010). Seasonal variations of phage life strategies and bacterial physiological states in three northern temperate lakes. *Environ Microbiol*, 12: 628–641.
- Nguyen-Kim H., Bouvier T., Bouvier C., Hai D. N., Lam N. N., Rochelle-Newall E., Baudoux A. C., Desnues C., Reynaud S., Ferrer-Pages C., Bettarel Y., 2014. High occurrence of viruses in the mucus layer of scleractinian corals. *Environmental Microbiology Reports*, 6: 675–682.
- Nguyen-Kim H., Bettarel Y., Bouvier T., Bouvier C., Doan-Nhu H., Nguyen-Ngoc L., Nguyen-Thanh T., Tran-Quang H., Brune J., 2015. Coral mucus is a hot spot of viral infection. *Applied and Environmental Microbiology*. Doi:10.1128/AEM.00542-15/
- Nguyen-Kim H., Bouvier T., Bouvier C., Bui N. V., Le-Lan H., Bettarel Y., 2015. Viral and Bacterial Epibionts in thermally-stressed corals. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3: 1272–1286.
- Patel A., Noble R. T., Steele J. A., Schwabach M. S., Hewson I., and Fuhrman J. A., 2007. Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I. *Nat Prot*, 2: 269–276.

- Reis A. M. M., Araujo S. D., Moura R. L., Francini R. B., Pappas G., Coelho A. M. A., Kruger R. H., và Thompson F. L., 2009. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1378–1387.
- Reshef L., Koren O., Loya Y., Zilber-Rosenberg I., and Rosenberg E., 2006. The Coral probiotic hypothesis. *Environmental Microbiology*, 8: 2068–2073.
- Ritchie K. B., 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology-Progress Series*, 322: 1–14.
- Rosenberg E., Kellogg C. A., and Rohwer F., 2007. A sea of microbes: coral microbiology. *Oceanography*, 20: 146–154.
- Rosenberg E., Kushmaro A., Kramarsky-Winter E., Banin E., Yossi L., 2009. The role of microorganisms in coral bleaching. *Isme Journal*, 3:139–146.
- Rypien K. L., Ward J. R., Azam F., 2010. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 12: 28–39.
- Shnit-Orland M., Sivan A., Kushmaro A., 2012. Antibacterial Activity of *Pseudoalteromonas* in the Coral Holobiont. *Microbial Ecology*, 64: 851–859.
- Suttle C. A., Feng C. 1992. Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl. Environ. Microbiol*, 58: 3721–3729.
- Suttle C. A. 2007. Marine viruses – major players in the global ecosystems. *Nat Rev Microbiol*, 5: 801–812.
- Van Oppen M. J. H., Leong J.A., Gates R.D., 2009. Coral-virus interactions: A double-edged sword? *Symbiosis*, 47: 1–8.
- Vega Thurber R. L., Burkepille D. E., Fuchs C., Shantz A. A., McMinds R., và Zaneveld J. R., 2014. Chronic nutrient enrichment increases prevalence and severity of coral disease and bleaching. *Global Change Biology*, 20: 544–554.
- Vega Thurber R. L., Correa A. M. S., 2011. Viruses of reef-building scleractinian corals. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408(1-2): 102–113.
- Vega Thurber R., Willner-Hall D., Rodriguez-Mueller B., Desnues C., Edwards R.A., Angly F., Dinsdale E., Kelly L., Rohwer F., 2009. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environmental Microbiology*, 11: 2148–2163.
- Weinbauer M. G., Suttle C. A., 1999. Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. *Aquat Microb Ecol*, 18: 217–225.

LIFE CYCLES OF CORAL-ASSOCIATED-VIRUSES RELATED TO DIFFERENT HEALTH STATES COLLECTED IN HANG RAI-NINH THUAN, VIETNAM

Nguyen Kim Hanh, Pham Thi Mien, Doan Nhu Hai

Institute of Oceanography, VAST

SUMMARY

In recent years, coral associated viruses could play primal role in protecting coral health, yet their ecological traits are poorly investigated. In this study, the abundance and life cycles (lysogeny and lytic) of viruses associated with contrasted coral health states (healthy and bleached) were studied and compared. In addition, the density of bacteria and *Symbiodium* were also be determined by epifluorescence microscopy. The results showed that viral abundance increased 1.2 times and bacterial abundance decreased 0.6 times in healthy corals compared to bleached ones. The number of *Symbiodinium* significantly reduced 5.6 times in bleached corals compared to healthy corals. One of the most important results in this study was the coexistence of the both lysogenic and lytic viruses in healthy coral. The fraction of lysogenic bacteria was 2 times higher in healthy corals than in bleached ones. Healthy corals carried 3.5-fold more viral production than the diseased ones. Overall, the results showed that, in healthy state, corals might be a favorable environment for viral infection,

promoting the development of both temperate and virulent phages. This coexistence might be crucial for coral viability through the complex links with their coral-associated bacterial hosts.

Keywords: coral, bleached, *Symbiodinium*, bacteria, virus, lysogeny, lytic.

Citation: Nguyen Kim Hanh, Pham Thi Mien, Doan Nhu Hai, 2018. Life cycles of coral-associated-viruses related to different health states collected in Hang Rai-Ninh Thuan, Vietnam. *Tap chi Sinh hoc*, 40(2): 223–232. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.8819>.

**Corresponding author email:* nguyenkimhanh84@gmail.com

Received 28 October 2017, accepted 20 September 2018