

## KHẢ NĂNG ỨC CHẾ VI KHUẨN GÂY BỆNH *VIBRIO* TRONG NƯỚC NUÔI TÔM CỦA *BACILLUS SUBTILIS* HY1 VÀ *LACTOCOCCUS LACTIS* CC4K

Đặng Phương Nga, Nguyễn Thị Yên, Đỗ Thu Phương, Nguyễn Bá Tú, Lại Thúy Hiền

Viện Công nghệ Sinh học

### TÓM TẮT

Vi khuẩn lactic và *Bacillus* spp. là những vi khuẩn thường được sử dụng rộng rãi trong các chế phẩm sinh học cho người và động vật nuôi giúp kích thích khả năng tiêu hóa. Tuy nhiên, trong các chế phẩm xử lý nước nuôi trồng thủy sản, các vi sinh vật này có thể đóng một vai trò hoàn toàn khác là cạnh tranh và hạn chế sự phát triển của nhóm vi khuẩn gây bệnh cho động vật nuôi. Hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. HY1 và vi khuẩn lactic CC4K được phân lập từ nước nuôi tôm và nước dưa đều có khả năng ức chế tốt các vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* HH1, *V. furnisii* VT14-1, *V. harvey* NC5-1 và *V. vulnificus* HH2. Chủng HY1 có khả năng kháng *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus sydowii*, *A. ustus*, *A. kilience*, nhưng không có khả năng kháng *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* và *Penicillium oxalicum*. Còn chủng CC4K chỉ có khả năng kháng một số vi sinh vật nhân sơ là *S. aureus*, *S. lutea* và *B. subtilis* và không kháng được các vi sinh vật nhân chuẩn. Kết quả phân loại dựa vào các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA cho thấy các chủng này là *Bacillus subtilis* HY1 với độ tương đồng 99% và *Lactococcus lactis* CC4K với độ tương đồng là 99,1%. Phân tích bằng sắc ký bản mỏng và phổ hồng ngoại cho thấy chất kháng khuẩn do chủng CC4K sinh ra có thể là lactic acid. Còn chủng HY1 có khả năng kháng vi sinh vật nhờ sinh một chất kháng sinh ngoại bào không có bản chất polypeptide. Nhờ có ưu điểm kháng tốt vi khuẩn gây bệnh cho tôm, nên hai chủng vi khuẩn trên hiện đang được thử nghiệm trong các chế phẩm sinh học để xử lý nước nuôi tôm tại một số địa phương.

**Từ khóa:** Chế phẩm sinh học, khả năng kháng *Vibrio*, hoạt tính kháng khuẩn, vi khuẩn lactic

### MỞ ĐẦU

Trong các nghiên cứu trước, chúng tôi đã lựa chọn được hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. HY1 và vi khuẩn lactic CC4K có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *Vibrio*, với mục tiêu để ứng dụng các chủng này vào chế phẩm làm sạch nước nuôi tôm (Đặng Phương Nga *et al.*, 2006). Vi khuẩn lactic là nhóm vi khuẩn sinh lactic acid, khi lactic acid đi qua màng tế bào, nó sẽ giải phóng ra proton H<sup>+</sup>, làm acid hóa nội bào, phá hủy cơ chế vận chuyển qua màng tế bào... dẫn đến tế bào chết (Moriarty, 1999). Ngoài ra một số vi khuẩn lactic còn có khả năng sinh bacteriocin hay những chất gần giống với bacteriocin. Các chất này có bản chất là kháng sinh nên có thể ức chế các tế bào trong cùng họ hay khác họ (Gonzle *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1992). Còn nhóm vi khuẩn *Bacillus*, có khả năng sinh các chất lipopeptide và các chất kháng sinh (Stein, 2005; Verschuere *et al.*, 2000). Chất lipopeptit hoạt động như chất hoạt hóa bề mặt do vậy tạo điều kiện để cho các tế bào vi khuẩn probiotic tiếp xúc với tế bào vi khuẩn gây bệnh, do vậy lactic

acid hay chất kháng sinh có thể xâm nhập vào tế bào (Verschuere *et al.*, 2000). Tuy nhiên, cơ chế hoạt động chính xác của vi khuẩn probiotic trong từng trường hợp là rất khác nhau và chưa được hiểu rõ hoàn toàn. Ở bài báo này, chúng tôi đi sâu phân loại hai chủng vi khuẩn trên và tìm hiểu cơ chế kháng khuẩn của các chủng.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Hai chủng vi khuẩn nghiên cứu gồm: HY1 và CC4K phân lập được từ nước nuôi tôm Hoàng Hóa (Thanh Hóa) và từ nước dưa.

Các chủng vi khuẩn *Vibrio*: *Vibrio parahaemolyticus* HH1, *V. furnisii* VT14-1, *V. harvey* NC5-1 và *V. vulnificus* HH2, được phân lập từ nước nuôi tôm tại Hoàng Hóa, Nông Công và từ nước biển ven bờ Bà Rịa - Vũng Tàu và đã phân loại dựa vào trình tự gen 16S rRNA (Lại Thúy Hiền *et al.*, 2006).

Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* ATCC 35128, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* KCCM 50235, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 50559, *Aspergillus sydowi*, *A. ustus*, *Penicillium oxalicum*, *Acremonium kiliense* (Phân loại hình thái theo Ricardo).

**Phương pháp**

Các chủng vi sinh vật được nuôi trên các môi trường đặc hiệu: môi trường MPA có bổ sung 5% NaCl cho vi khuẩn hiếu khí, môi trường MRS cho vi khuẩn lactic, môi trường TCBS cho phân lập vi khuẩn *Vibrio*, môi trường Hansen cho nấm men và môi trường Czapeck Dox cho nấm mốc.

Khả năng kháng vi sinh vật được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Các chủng vi khuẩn kháng *Vibrio* và vi sinh vật kiểm định được nuôi cấy trên môi trường dịch thể như đã nêu trên, đến giữa pha log. 30 µl dịch nuôi cấy chủng HY1 hoặc 50 µl dịch nuôi cấy chủng CC4K được nhỏ vào các lỗ thạch. Vòng kháng khuẩn được quan sát sau 24 h nuôi cấy ở 30°C đối với vi khuẩn và 96 h đối với nấm men và nấm mốc.

Phân loại vi khuẩn bằng kit chuẩn sinh hóa API 50 CHL, API 50 CHB kết hợp với xác định trình tự gen 16S rRNA.

DNA tổng số được tách chiết theo Sambrook

và Russell (2001). Nhân đoạn gen 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR, sử dụng cặp mồi 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') và 1525r (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC -3'). Trình tự nucleotide được đọc trên máy Avant Genetic Analyzer 3100 (ABI, Mỹ), sử dụng hai cặp mồi 350r (5'-CTGCTGCCTCCCGTAG -3'), 780f (5'-GATTAGATACCCTGGTAG -3') và 920r (5'-GTCAATTCCTTTGAGTTT), 1100f (5'-GCAACGAGCGCAACGC -3').

Dịch nuôi cấy vi khuẩn sau khi đã ly tâm loại sinh khối, được chiết bằng ethyl acetate 1:1 (pH 2; 3,6; 10) và cô đặc bằng máy cô chân không. Sắc ký bản mỏng được tiến hành trên bản silica gel (60 F<sub>254</sub>, 0,25 mm, Merck), trong ethyl acetate.

Chất kháng khuẩn sau khi tách sơ bộ bằng sắc ký bản mỏng, được hòa tan trong ethyl acetate để phân tích phổ hồng ngoại (Viện Hóa học).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Khả năng kháng *Vibrio* và phổ tác động kháng vi sinh vật**

Sau khi đã phân lập và sơ bộ lựa chọn hai chủng vi khuẩn HY1 và CC4K, chúng tôi xác định khả năng kháng một số loại vi khuẩn *Vibrio* là những vi khuẩn gây bệnh điển hình trong nước nuôi tôm và khả năng kháng một số vi sinh vật kiểm định để lựa chọn chủng có khả năng kháng khuẩn tốt.

**Bảng 1.** Khả năng kháng vi sinh vật của chủng HY1 và CC4K.

Vi sinh vật kiểm định	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
	HY1	CC4K
<i>V. parahaemolyticus</i> HH1	25	20
<i>V. harvey</i> NC5-1	21	13
<i>V. vulnificus</i> HH2	32	12
<i>V. furnisii</i> VT14-1	28	13
<i>E. coli</i>	0	0
<i>S. aureus</i>	19,5	15,5
<i>S. lutea</i>	17	19
<i>B. subtilis</i>	20	13
<i>C. albicans</i>	16	0
<i>S. cerevisiae</i>	0	-
<i>A. sydowi</i>	19	0
<i>A. ustus</i>	14,5	0
<i>P. oxalicum</i>	0	0
<i>A. kiliense</i>	17	0

Cả hai chủng vi khuẩn đều có khả năng kháng tốt các chủng *Vibrio* (Bảng 1). Chủng HY1 phát triển cực đại sau 20 h nuôi cấy, tuy nhiên hoạt tính kháng khuẩn của chủng đạt cực đại ở 24 h. Chủng CC4K phát triển cực đại và cho hoạt tính kháng khuẩn tối ưu ở 47 h nuôi cấy, đường kính vòng vô khuẩn đối với *V. parahaemolyticus* đo được đạt 21,5 mm.

Chủng HY1 có phổ tác động vi sinh vật tương đối rộng, kháng 7 trong số 10 chủng vi sinh vật kiểm

định, nhưng không có khả năng kháng *E. coli*, *S. cerevisiae* và *P. oxalicum* (Bảng 1). Chủng CC4K tuy cũng kháng được các chủng vi khuẩn *Vibrio* nhưng chỉ kháng được 3 trong số 9 chủng vi sinh vật kiểm định: *S. lutea*, *S. aureus*, và *B. subtilis* (Bảng 1). Như vậy, có thể thấy hai chủng này sinh các chất kháng khuẩn có bản chất hoàn toàn khác nhau. Chất kháng khuẩn do chủng CC4K sinh ra không kháng được các loài vi sinh vật nhân chuẩn đã thử nghiệm.

**Bảng 2.** Kết quả 49 phản ứng của kit chuẩn API 50 CHB và 50 CHL của chủng HY1 và CC4K.

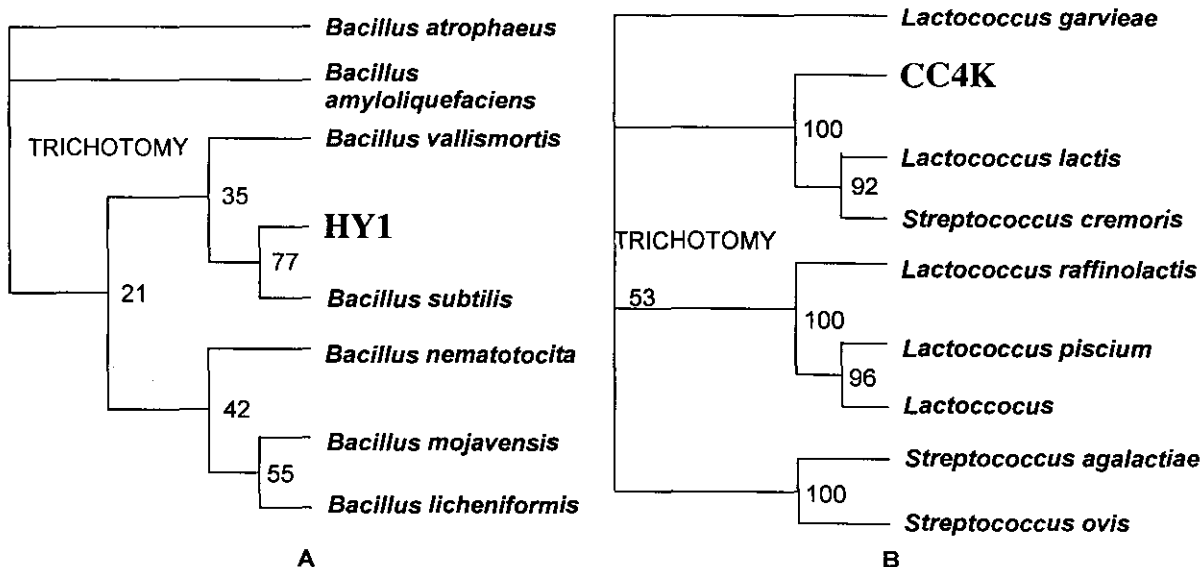
Số TT	Phản ứng	Cơ chất	HY1	CC4K	Số TT	Phản ứng	Cơ chất	HY1	CC4K
1		Đối chứng	-	-	27	SAL	Salicin	+	+
2	GLY	Glycerol	+	-	28	CEL	D-cellobiose	+	+
3	ERY	Erythritol	-	-	29	MAL	D-maltose	-	+
4	DARA	D-arabinose	-	-	30	LAC	D-lactose	-	±
5	LARA	L-arabinose	+	+	31	MEL	D-melibiose	-	-
6	RIB	D-ribose	+	+	32	SAC	D-saccharose	+	+
7	DXYL	D-xylose	-	+	33	TRE	D-trehalose	+	+
8	LXYL	L-xylose	-	-	34	INU	Inulin	-	-
9	ADO	D-Adonitol	-	-	35	MLZ	D-melezitose	-	-
10	MDX	Methyl-β D-xylopyranoside	-	-	36	RAF	D-raffinose	-	-
11	GAL	D-galactose	-	+	37	AMD	Amidon	-	+
12	GLU	D-glucose	+	+	38	GLYG	Glycogen	-	-
13	FRU	D-fructose	+	+	39	XLT	Xylitol	-	-
14	MNE	D-manose	+	+	40	GEN	Gentiobiose	+	+
15	SBE	L-sorbose	-	-	41	TUR	D-turanose	-	-
16	RHA	L-rhamnose	-	-	42	LYX	D-lyxose	-	±
17	DUL	Dulcitol	-	-	43	TAG	D-tagatose	+	-
18	INO	Inositol	-	-	44	DFUC	D-fucose	-	-
19	MAN	D-manitol	+	+	45	LFUC	L-fucose	-	-
20	SOR	D-sorbitol	-	-	46	DARL	D-arabitol	-	-
21	MDM	Methyl-β D-manopyranoside	-	-	47	LARL	L-arabitol	-	-
22	MDG	Methyl-β D-glucopyranoside	-	-	48	GNT	Potassium gluconate	-	±
23	NAG	N-acetyl glucosamine	+	+	49	2KG	Potassium 2-ketogluconate	-	-
24	AMY	Amygdalin	+	+	50	5KG	Potassium 5-ketogluconate	-	-
25	ARB	Arbutin	+	+	51	SAL	Salicin	+	-
26	ESC	Esculin	+	-					

**Phân loại hai chủng vi khuẩn**

Chủng HY1 có khả năng sinh bào tử trên môi trường MPA có bổ sung MnSO<sub>4</sub>. Kết hợp đặc điểm hình thái, khả năng sinh bào tử và sử dụng kit phân loại API 50 CHB cho thấy chủng HY1 thuộc chi *Bacillus* (Bảng 2). Tiếp tục phân loại bằng xác định trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng này thuộc

loài *Bacillus subtilis* với độ tương đồng là 99% (Hình 1).

Chủng CC4K có khả năng sinh lactic acid và không sinh bào tử. Sử dụng kit API 50 CHL (Bảng 2) kết hợp với phân tích trình tự gen 16S rRNA để phân loại chủng này cho thấy chủng CC4K thuộc loài *Lactococcus lactis* với độ tương đồng đạt 99,1% (Hình 1).



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại của chủng HY1 (A) và CC4K (B).

**Bản chất kháng khuẩn của chủng HY1 và CC4K**

**Chủng HY1**

*Bacillus subtilis* được biết đến với khả năng sinh hơn 24 loại kháng sinh có cấu trúc rất khác nhau bao gồm phần lớn là các polypeptide, hay không phải là peptide như polyketide, aminosugar và phospholipid (Stein, 2005).

Để xác định bản chất polypeptide của chất kháng khuẩn do chủng HY1 sinh ra, dịch nuôi cấy chủng HY1, sau khi đã ly tâm loại tế bào được xử lý với proteinase K hoặc trypsin. Kết quả các phản ứng enzyme cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tương đương với đối chứng không có enzyme. Đường kính vòng kháng khuẩn đo được là 18 ± 2 mm đối với *V. parahaemolyticus*. Sắc ký bản mỏng dịch nuôi cấy chủng HY1 cho một vòng vô khuẩn có chỉ số R<sub>f</sub> là

0,54. Sử dụng ninhydrin (0,1%) để hiện màu amino acid trong thành phần chất kháng khuẩn cũng cho kết quả âm tính. Các kết quả này loại bỏ khả năng chất kháng khuẩn này là polypeptide.

Trong số các chất kháng sinh do *Bacillus subtilis* sinh ra, những chất không có bản chất peptide có thể gồm: bacilysoxin (phospholipid), bacillaene (hexaene), difficidin (macrolide phosphate), amicoumacin (hợp chất phenol), corynebactin (siderophore) (Norimasa et al., 2002; Pramathesh et al., 1995; Sheldon et al., 1986; Irina et al., 2002; Stein, 2005). Tuy nhiên, amicoumacin có huỳnh quang màu vàng xanh khi quan sát ở bước sóng 310 nm (Irina et al., 2002). Còn bacillaene chỉ ức chế quá trình sinh tổng hợp protein của vi sinh vật nhân sơ, nên không có tác động kháng sinh vật nhân chuẩn (Pramathesh et al., 1995). Do vậy, chất kháng khuẩn do chủng HY1 sinh ra không phải là amicoumacin

hay bacillaene. Tuy nhiên, để xác định chất kháng khuẩn này còn cần phải tinh sạch chất này bằng HPLC và so sánh với các kháng sinh chuẩn như bacilysoicin, difficidin và corynebactin hoặc phân tích NMR.

### Chủng CC4K

Vi khuẩn lactic là nhóm vi sinh vật probiotic đầu tiên được sử dụng cho cả người và động vật nuôi. Khả năng ức chế và kìm hãm các vi sinh vật khác của vi khuẩn lactic có thể do các acid hữu cơ (lactic, phenyllactic, acetic acid), các chất kháng khuẩn có bản chất protein như bacteriocin, hoặc reuterin do vi khuẩn sinh ra (Gonzle *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Phạm Thị Ngọc Lan *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1992; Verschuere *et al.*, 2000).

Dịch nuôi cấy chủng CC4K sau khi đã ly tâm loại tế bào được xử lý bằng proteinase K hoặc trypsin, kết quả cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của chủng không mất đi mà hầu như không thay đổi khi được xử lý enzyme. Đường kính vòng kháng khuẩn đối với *V. parahaemolyticus* là  $15 \pm 1$  mm. Kết quả hiện màu acid amin bằng dung dịch ninhydrin sau khi chạy sắc ký bản mỏng là âm tính, khẳng định lại chất kháng khuẩn do chủng CC4K sinh ra không có bản chất protein. Như vậy, có nhiều khả năng chất này là acid hữu cơ.

Để khẳng định điều này, dịch nuôi cấy sau khi đã loại tế bào được chỉnh về pH 7 bằng dung dịch NaOH và thử khả năng kháng *Vibrio*. Kết quả là hoạt tính kháng khuẩn mất hoàn toàn. Điều này chứng tỏ khả năng kháng khuẩn trong dịch nuôi cấy là do tính acid của dịch. Acetic acid được biết đến nhiều với khả năng kháng các loại nấm mốc (Paola *et al.*, 2000). Tuy nhiên, khi thử khả năng kháng nấm của chủng CC4K thấy chủng này không kháng được cả 4 loại nấm: *A. sydowi*, *A. ustus*, *P. oxalicum* và *A. kiliencie* (Bảng 1). Do vậy, chất kháng khuẩn do chủng CC4K sinh ra có thể không phải là acetic acid.

Chạy sắc ký bản mỏng chất kháng khuẩn CC4K với lactic acid chuẩn cho thấy,  $R_f$  của chất CC4K là 0,44; gần trùng với  $R_f$  của lactic acid 0,46 (Hình 2). Chất kháng khuẩn CC4K sau khi tách sơ bộ bằng sắc ký bản mỏng được chạy phổ hồng ngoại. Kết quả cho thấy phổ hồng ngoại của chất kháng khuẩn CC4K ở bước sóng 1200-1700  $cm^{-1}$  giống hoàn toàn với phổ hồng ngoại của lactic acid chuẩn (Hình 3). Như vậy, có thể khẳng định hoạt tính kháng khuẩn chính của chủng CC4K là do lactic acid. Theo Moriarty, vi khuẩn lactic sinh lactic acid, và khi

lactic acid đã đi qua màng tế bào, nó sẽ giải phóng ra proton  $H^+$ , làm acid hóa nội bào, phá hủy cơ chế vận chuyển qua màng tế bào và dẫn đến tế bào chết (Moriarty *et al.*, 1999).



Hình 2. Sắc ký bản mỏng dịch nuôi cấy chủng CC4K và acid lactic. 1: Lactic acid; 2: Chủng CC4K.

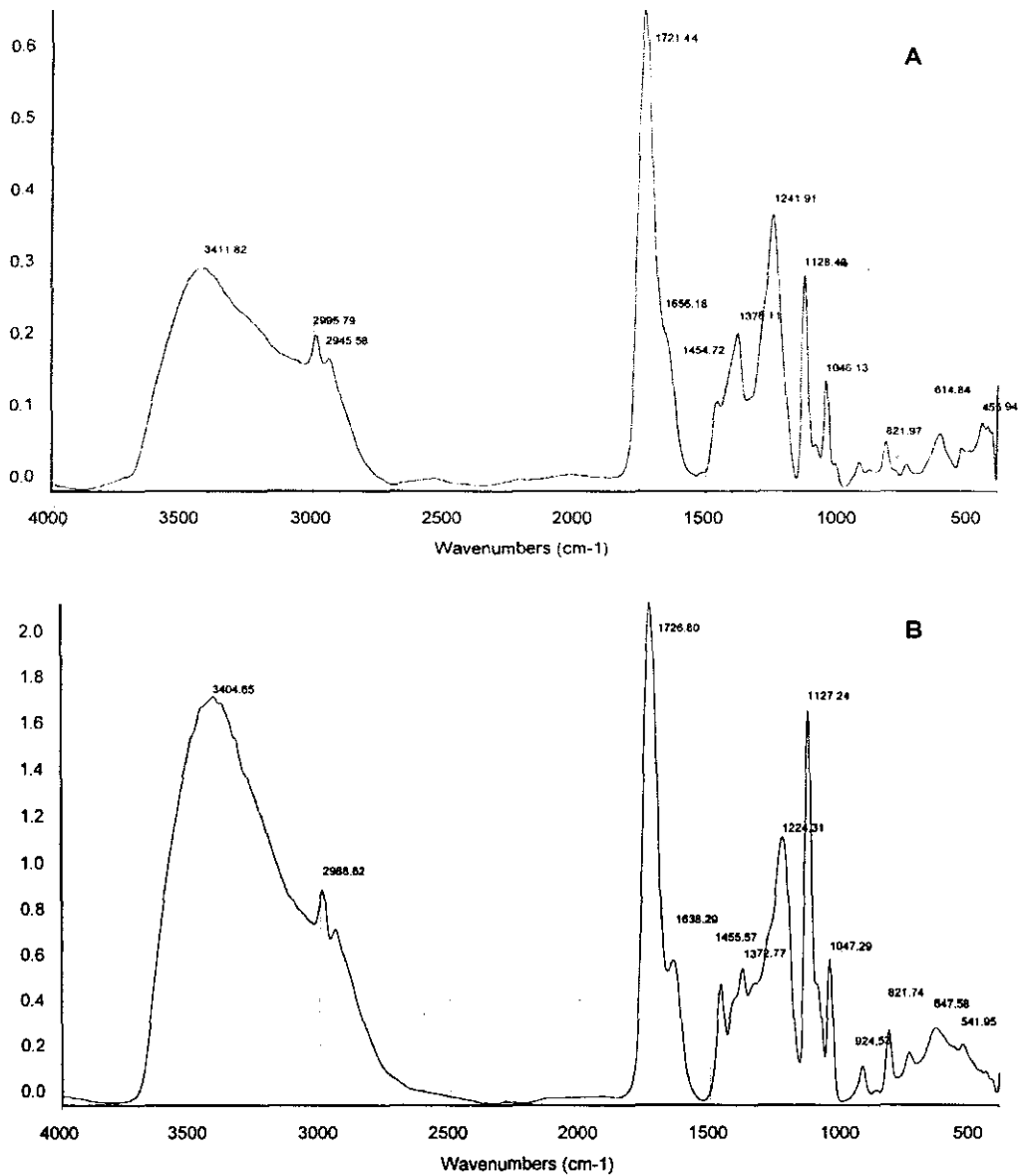
### KẾT LUẬN

Hai chủng vi khuẩn HY1 và CC4K có khả năng kháng tốt vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, *V. furnisii*, *V. harvey* và *V. vulnificus*, điển hình trong nước nuôi tôm. Ngoài ra, hai chủng này còn có khả năng kháng một số vi sinh vật: chủng HY1 kháng *S. aureus*, *S. lutea*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. sydowi*, *A. ustus*, *A. kiliencie*, nhưng không có khả năng kháng *E. coli*, *S. cerevisiae* và *P. oxalicum*, còn chủng CC4K chỉ có khả năng kháng một số vi sinh vật nhân sơ là *S. aureus*, *S. lutea* và *B. subtilis*.

Phân loại hai chủng này dựa vào các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy: chủng HY1 thuộc loài *B. subtilis* và chủng CC4K thuộc loài *L. lactis*.

Khả năng kháng vi sinh vật của chủng CC4K có thể do sinh lactic acid. Chủng HY1 có khả năng kháng vi sinh vật nhờ sinh một chất kháng sinh ngoại bào không có bản chất polypeptide.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện với sự tài trợ của đề tài nghiên cứu cơ sở Viện Công nghệ sinh học 2006.



Hình 3. Phổ hồng ngoại chất CC4K thô và lactic acid chuẩn. A. Chất CC4K thô; B. Lactic acid chuẩn.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đặng Phương Nga, Vương Thị Nga, Phạm Thị Hằng, Lại Thúy Hiền (2006) Khả năng đối kháng với *Vibrio* trong nước nuôi tôm của một số chủng vi khuẩn lựa chọn. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(3): 379-387.

Gonzle MG, Hultzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP

(2000) Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4325-4333.

Irina VP, Philippe B, Irina BS, Bernard V, Maria CU (2002) Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Res Microbiol* 153: 269-276.

Lại Thúy Hiền, Nguyễn Thị Yên, Đỗ Thu Phương, Nguyễn Bá Tú, Phạm Thị Hằng, Vương Thị Nga, Kiều Quỳnh Hoa, Đặng Phương Nga (2006) Đa dạng *Vibrio* trong nước nuôi tôm công nghiệp Thanh Hóa. *Hội nghị Khoa học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Lần thứ tư*, Hà Nội: 339-348.

Lee JY, Hwang KY, Kim K, Sung S, Park YS, Paik MJ, Kim KR (2002) Characteristics of antimicrobial organic acids produced by *Lactobacillus pentosus* K34 isolated from small intestines of Korean native chickens. *Kor J Microbiol Biotechnol* 30(3): 241-246.

Moriarty DJW (1999) Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *Proceedings of the 8<sup>th</sup> International symposium on Microbial Ecology*, Halifax Canada.

Norimasa T, Yoshiko OH, Susumu O, Makoto U, Masa H, Hiroshi N, Kozo O (2002) Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob Agents Chemother* 46(2): 315-320.

Paola L, Francesca V, Antonio E, Silvia L, Aldo C, Marco G (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol* 66(9): 4084-4090.

Phạm Thị Ngọc Lan, Trần Thị Thúy, Lê Thanh Bình (1999) Đặc tính hóa phân loại chủng vi khuẩn Lactic sinh bacterioxin có phổ tác dụng rộng. *Hội nghị Công*

*nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội, 314-318.

Pramathesh SP, Stella H, Susan F, Dolores P, Carol A, Loretta D, Edward M, Prabhavathi F, Friedrich M (1995) Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J Antibiotics* 48(9): 997-1003.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sheldon BZ, Cheryl DS, Richard LM, Barbara AP, Barbara W, Evemarie CG, Sagrario M, Sebastian H, Sara AC, Enrique T, Edward OS (1986) Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *J Antibiotics* XL(12): 1677-1681.

Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56(4): 845-857.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 655-671.

Yang R, Johnson MC, Ray B (1992) Novel method to extract large amount of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58(10): 3355-3359.

## INHIBITORY ACTIVITY AGAINST *VIBRIO* IN SHRIMP FARMING WATER OF *BACILLUS SUBTILIS* HY1 AND *LACTOCOCCUS LACTIS* CC4K

Dang Phuong Nga, Nguyen Thi Yen, Do Thu Phuong, Nguyen Ba Tu, Lai Thuy Hien\*

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

Lactic acid bacteria and *Bacillus subtilis* are widely used as probiotic for human and animal in order to improve the host digestion. However, in probiotic for shrimp pond water treatment, these bacteria may play different roles as competitor and inhibitor of pathogenic bacteria. *Bacillus* sp. strain HY1 and lactic acid bacterium, strain CC4K isolated from shrimp pond water and fermented cabbage, showed inhibitory activity against *Vibrio parahaemolyticus* HH1, *V. furnisii* VT14-1, *V. harvey* NC5-1 and *V. vulnificus* HH2. Strain HY1 showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus sydowi*, *A. ustus*, *A. kilience*, but no inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Penicillium oxalicum*. Strain CC4K exhibited inhibitory activity against only some prokaryotic microorganisms as *S. aureus*, *S. lutea*, *B. subtilis* and was not capable of inhibiting eukaryotic microorganisms. Classification of these strains based on their morphological, physiological characteristics and 16S rRNA analysis revealed that they are *B. subtilis*

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562000; Fax: 84-4-7564483; E-mail: [hien.pm@ibt.ac.vn](mailto:hien.pm@ibt.ac.vn)

HY1 and *Lactococcus lactis* CC4K with 99% and 99.1% identity, respectively. Thin layer chromatography and infrared analysis showed that the antibacterial compound produced by strain CC4K might be lactic acid. The antimicrobial activity of strain HY1 was due to an extracellular non-polypeptide antibiotic. Because of their antibacterial activity, the two strains currently used as probiotic for shrimp pond water treatment at some locations in Vietnam.

**Keywords:** *Antimicrobial activity, lactic acid bacteria, inhibitory activity against Vibrio, probiotic*