

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN LIÊN KẾT SÁU LOÀI HẢI MIỀN VÙNG BIỂN SƠN CHÀ

Phạm Việt Cường*, Nguyễn Mai Anh, Vũ Thị Quyên, Nguyễn Thị Kim Cúc
Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *cuongwg@yahoo.com

TÓM TẮT: Hải miền được biết là vật chủ của nhiều loài vi sinh vật, bằng phương pháp nuôi cấy, đã phân lập được 2640 chủng vi khuẩn liên kết với 6 loài hải miền từ bán đảo Sơn Chà. Hai loài hải miền *Cliona viridis* (LC25) và *Callyspongia australis* (LC26) có số lượng vi khuẩn liên kết phân lập được nhiều nhất, từ loài *Agelas dirpar* (LC27) phân lập được số vi khuẩn liên kết ít nhất. Hoạt tính kháng khuẩn của 17 chủng vi khuẩn tuyển chọn đã được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Trong số đó, chỉ có 3 chủng có khả năng ức chế sinh trưởng của cả 2 loài *Vibrio parahaemolyticus* và *V. vulnificus*. Chủng LC27cs1 có hoạt tính ức chế sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* mạnh nhất, với đường kính vòng ức chế 21,3 mm. Bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA, ba chủng vi khuẩn có khả năng ức chế đồng thời cả hai nguồn bệnh *Vibrio* và nấm chùng khác tạo vòng kháng khuẩn lớn hơn 10 mm được định danh đến loài. Hầu hết các chủng phân lập thuộc chi *Bacillus* (7/8 chủng) và chỉ có một chủng LC25cs5 phân lập từ loài hải miền *Cliona viridis* được nhận dạng là *Paenibacillus barengoltzii*.

Từ khóa: *Bacillus*, *Vibrio*, 16S rRNA, hải miền biển, vi khuẩn, Sơn Chà.

MỞ ĐẦU

Hải miền được biết là vật chủ nhiều vi sinh vật và vai trò của những vi sinh vật này thay đổi theo nguồn dinh dưỡng và sự cộng sinh với hải miền. Dựa trên những nghiên cứu cộng đồng vi sinh vật bằng các phương pháp như điện di gel gradient biến tính (DGGE), giải trình tự gen 16S rRNA và lai huỳnh quang *in-situ* (FISH), người ta nhận thấy có tới hơn 25 ngành vi khuẩn liên kết với hải miền. Trong số đó có Proteobacteria, Nitrospira, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Acidobacteria, Poribacteria và Verrucomicrobia, ngoài các thành viên của Archaea. Các quần thể vi sinh vật khác sống trong hải miền còn có vi nấm và vi tảo. Sự đa dạng này có thể giải thích một phần bởi sự thay đổi các điều kiện lý, hóa, sinh trong hải miền, có thể ảnh hưởng đến sinh thái vi sinh vật và tiến hóa. Vi sinh vật liên kết với hải miền còn có cả nội bào và ngoại bào [7, 8].

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về thành phần hải miền ở vịnh Hạ Long, Nha Trang cho thấy thành phần loài của chúng rất đa dạng [1, 2], một số công bố về tách chiết các chất có hoạt tính sinh học từ hải miền biển Việt Nam [9, 10]. Những nghiên cứu về vi sinh vật liên kết động vật biển nói chung và hải miền nói riêng

chưa được chú ý. Đến nay chỉ có một số công trình về phân lập và xác định hoạt tính sinh học của vi sinh vật biển của các nhà khoa học trong nước [4, 17].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu là các mẫu hải miền được thu thập bằng thiết bị SCUBA (self contained underwater breathing apparatus) tại vùng biển chân đèo Hải Vân và bán đảo Sơn Chà.

Môi trường phân lập vi khuẩn (Marine Agar 2216) (g/l): Peptone 5,0, cao nấm men 1,0, citrate sắt - 0,1, NaCl - 19,45, MgCl₂.6H₂O - 8,8, Na₂SO₄ - 3,24, CaCl₂.2 H₂O - 1,8, KCl - 0,55, NaHCO₃ - 16, KBr - 0,08, thạch - 20,0. Các loại vi lượng (mg/l): SrCl₂ - 34,0, H₃BO₃ - 22,0, Na₂(SiO₂)_nO - 4,0, NaF - 2,4, NH₄NO₃ - 1,6, Na₂HPO₄ - 8,0. Ngoài ra, còn một số hóa chất dùng trong nuôi cấy vi sinh vật như NaCl 0,9%, nước biển nhân tạo.

Nước biển nhân tạo có thành phần (g/l) bao gồm: MgSO₄.7H₂O: 3,50; NaHCO₃: 0,11; MgCl₂.6H₂O: 4,80; CaCl₂.2 H₂O: 1,60; KCl: 0,77 và NaCl: 28,13.

Môi trường TCBS (thiosulfate citrate bile salts sucrose) (g/l): cao men 5; Peptone 10; Sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃) 10; Sodium citrate (C₆H₅ Na₃O₇) 10; Ox gall 5; Sodium

cholate (C₂₄H₃₉O₅Na) 3; Saccharose 20; NaCl 10; Ferric citrate (C₆H₅FeO₇) 1; Bromothymol blue 0,04; thymol blue 0,04; thạch 15.

Phân lập vi khuẩn liên kết hải miên [16]

Mẫu được chuyển từ tủ -20°C sang hộp xốp có đá, để rã đông từ từ. Lấy 1 gram hải miên cho vào cối sứ, rửa ba lần bằng nước biển nhân tạo. Hải miên sau khi rửa được bổ sung 1 ml nước biển nhân tạo và nghiền kỹ. Lấy 100 µl dịch nghiền hải miên cấy trải lên đĩa Petri có môi trường Marine Agar 2216. Nuôi ở nhiệt độ 30°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, chọn các khuẩn lạc đặc trưng, riêng rẽ, làm sạch lại trên môi trường phân lập và giữ giống cho những nghiên cứu tiếp theo.

Đánh giá hoạt tính đối kháng *Vibrio* spp.

Sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Các chủng vi khuẩn kiểm định và vi khuẩn phân lập được hoạt hóa trong môi trường lỏng thích hợp qua đêm. Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi trong môi trường và nhiệt độ thích hợp 24 giờ. Các chủng vi khuẩn kiểm định được cấy trải trên môi trường đặc TCBS với mật độ cuối cùng 1-1,5x10⁵/ml. Các đĩa Petri có môi trường TCBS đã được cấy vi sinh vật kiểm định được đục một số lỗ đường kính 8 mm bằng dụng cụ chuyên dụng. Lấy 100 µl vi khuẩn phân lập đã được nuôi 24 giờ đổ vào lỗ. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng để dịch nuôi cấy

phân tán vào thạch. Nuôi các đĩa ở 30°C. Sau 24 giờ, xác định đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh lỗ thạch (D-d) mm. Trong đó, D là đường kính vòng kháng khuẩn và lỗ; d là đường kính lỗ đục sẵn trên đĩa thạch.

Một số phương pháp sinh học phân tử: tách DNA vi khuẩn, PCR, tách dòng gen theo Sambrook et al. (2001) [14]. Giải trình tự gen trên máy giải trình tự tự động ABI PRISM^R 3100 (Viện Công nghệ sinh học).

Định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA

Một số chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi qua đêm, tách DNA tổng số từ sinh khối vi khuẩn. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen 16S rRNA vi khuẩn và tiến hành PCR để tách dòng gen. Làm sạch và giải trình tự gen. So sánh trình tự nhận được với các trình tự tương ứng trong Ngân hàng Gen quốc tế.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn liên kết hải miên

Bằng các bước thực hiện theo phương pháp trình bày ở trên, đã phân lập được vi khuẩn liên kết hải miên. Các mẫu hải miên gồm *Haliclona oculata* (LC03), *Amphius huxleyi* (LC10), *Dycidea cinerea* (LC22), *Cliona viridis* (LC25), *Callyspongia australis* (LC26) và *Agelas dirpar* (LC27). Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn từ các mẫu hải miên nghiên cứu (CFU/g)

| STT | Tên mẫu | Lượng vi khuẩn | STT | Tên mẫu | Lượng vi khuẩn |
|-----|---------|----------------|-----|---------|----------------|
| 1 | LC03 | 360 | 4 | LC25 | 560 |
| 2 | LC10 | 370 | 5 | LC26 | 820 |
| 3 | LC22 | 380 | 6 | LC27 | 150 |

CFU: đơn vị tạo khuẩn lạc.

Có thể thấy, số lượng vi khuẩn liên kết với hải miên thay đổi tùy theo mẫu hải miên. Lượng vi khuẩn liên kết hải miên phân lập được từ ba mẫu LC03, LC10 và LC22 gần tương đương nhau, từ 360-380 CFU/g. Hai loài hải miên *Cliona viridis* (LC25) và *Callyspongia australis* (LC26) có số lượng vi khuẩn liên kết phân lập được nhiều nhất (tương ứng 560 và 820 CFU/g), từ loài *Agelas dirpar* (LC27) phân lập được số vi khuẩn liên kết ít nhất, chỉ 150 CFU/g mẫu (bảng 1).

Những nghiên cứu phát sinh loài đã nhận diện được 26 ngành vi khuẩn khác nhau liên kết hải miên biển, trong đó có ngành Poribacteria hầu như chỉ tìm thấy trong hải miên [15], điều này cho thấy, thành phần vi sinh vật liên kết hải miên biển rất phức tạp. Theo Schmitt et al. (2012) [15], các loài hải miên khác nhau chứa quần thể vi khuẩn gồm các loài khác nhau (quần thể đặc trưng loài) và có quần thể nòng cốt. Nhưng các loài vi khuẩn trong các loài hải miên khác nhau vẫn có mối quan hệ gần hơn so với

các loài vi khuẩn ở môi trường nước xung quanh.

Li et al. (2006) [8] đã sử dụng phương pháp lấy dấu điện di gel gradien biến tính gen 16S rDNA (16S rDNA-DGGE fingerprinting) không qua nuôi cấy và phân tích phát sinh loài và sự đa dạng của cộng đồng vi sinh vật liên kết với 4 loài hải miên *Stelletta tenui*, *Halichondria*, *Dysidea avara* và *Craniella australiensis* ở biển nam Trung Quốc. Kết quả nhận được cho thấy, Proteobacteria (α , β và γ subdivisions) là những vi khuẩn chiếm ưu thế và có lẽ có quan hệ cộng sinh mật thiết với hải miên. Hải miên *Craniella australiensis* có sự đa dạng vi sinh vật lớn nhất, với 4 ngành vi khuẩn là Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes và Actinobacteria; tiếp đến là *Dysidea avara* với 2 ngành Proteobacteria và Bacteroidetes; và hải miên *Stelletta tenui*, *Halichondria* với ngành Proteobacteria. Lee et al. (2009) [7] đã sử dụng phương pháp nuôi cấy và không nuôi cấy để đánh giá liệu hải miên cùng loài hoặc cùng giống quanh đảo San Juan (Washington) có các quần thể vi sinh vật đặc hiệu không. Kết quả cho thấy, quần thể vi sinh vật liên kết *Myxilla incrustans* và *Haliclona rufescens* rất giống nhau, trong khi với loài *Halichondria panicea* lại rất khác [7]. Kumar et al. (2013) [6] đã phân lập được các loài vi khuẩn *Vibrio diazotrophicus*, *Bacillus subtilis*, *B. firmus*, *Thalassomonas agarivorans*, *Oleiphilus messinensis*, *Planococcus maritimus* và *Brevundinomonas vesicularis* từ hải miên biển *Hyattella cribriformis*.

Kết quả phân lập vi khuẩn liên kết 6 loài hải miên biển Việt Nam cho thấy, các khuẩn lạc mọc trên môi trường Marine Agar 2216 từ các mẫu hải miên khác nhau cũng rất đa dạng. Có thể phân nhóm sự đa dạng về hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn từ các mẫu hải miên từ cao đến thấp như sau: LC26>LC25>LC22>LC10>LC03>LC27. Mẫu hải miên LC25 và LC 26 có số lượng vi khuẩn phân lập được đa dạng nhất, và nghèo vi khuẩn liên kết nhất là hải miên LC27.

Xác định hoạt tính đối kháng *Vibrio* spp. của một số chủng phân lập

Bảng phương pháp mô tả, đã xác định được hoạt tính ức chế sinh trưởng hai loài *Vibrio* gây

bệnh cho thủy động vật là *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio vulnificus* của một số chủng vi khuẩn phân lập (bảng 2).

Bảng 2. Hoạt tính ức chế sinh trưởng *Vibrio* spp. của một số chủng vi khuẩn phân lập

| STT | Ký hiệu chủng | Hoạt tính ức chế (D-d) mm | |
|-----|---------------|----------------------------|----------------------|
| | | V. <i>parahaemolyticus</i> | V. <i>vulnificus</i> |
| 1 | LC03cs2 | 5,3 | 8,7 |
| 2 | LC10cs2 | 0 | 8,0 |
| 3 | LC10b3 | 6,0 | 0 |
| 4 | LC22cs2 | 10,7 | 0 |
| 5 | LC22cs5 | 5,3 | 10,7 |
| 6 | LC22b1 | 0 | 2,3 |
| 7 | LC22b2 | 0 | 13,3 |
| 8 | LC25cs2 | 6,7 | 15,3 |
| 9 | LC25cs5 | 15,0 | 0 |
| 10 | LC25b4 | 5,7 | 0 |
| 11 | LC26cs5 | 5,3 | 0 |
| 12 | LC26b2 | 7,0 | 6,7 |
| 13 | LC26b7 | 3,3 | 0 |
| 14 | LC27cs1 | 21,3 | 0 |
| 15 | LC27cs2 | 11,3 | 0 |
| 16 | LC27b1 | 10,7 | 0 |
| 17 | LC27b2 | 6,7 | 0 |

Từ 2.640 chủng vi khuẩn liên kết 6 loài hải miên phân lập được, chỉ tuyển chọn được 17 chủng có hoạt tính ức chế sinh trưởng của *Vibrio parahaemolyticus* và *V. vulnificus*. Kết quả nhận được cho thấy hoạt tính ức chế sinh trưởng 2 chủng *Vibrio* của các chủng phân lập không cao, đa số đường kính vòng ức chế dưới 10 mm. Chỉ có 3 trong số 17 chủng tuyển chọn có khả năng ức chế sinh trưởng của cả *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* (LC03cs2, LC22cs5 và LC25cs2), các chủng còn lại thể hiện hoạt tính kháng khuẩn hoặc với *V. parahaemolyticus* hoặc với *V. vulnificus*. Chủng LC27cs1 có hoạt tính ức chế sinh trưởng của *V. parahaemolyticus* mạnh nhất, với đường kính vòng ức chế hơn 20 mm. Chủng *V. vulnificus* có khả năng kháng 17 chủng vi khuẩn phân lập mạnh hơn so với chủng *V. parahaemolyticus*, chỉ có 7/17 chủng thể hiện hoạt tính đối kháng *V. vulnificus*, trong khi đó

chỉ có 3/17 chủng không có khả năng ức chế sinh trưởng của *V. parahaemolyticus*.

Radjasa (2007) [12] đã chọn được 2 trong số 90 chủng vi khuẩn phân lập từ hải miên có hoạt tính đối kháng *Escherichia coli*. Penesyan et al. (2011) [11] phân lập một số chủng vi khuẩn từ hải miên *Cymbastela concentrica* và đã xác định được tropodithietic acid là hợp chất chịu trách nhiệm chính cho hoạt tính kháng khuẩn của chúng. Yung et al. (2011) [19] đã phát hiện 3 enzymes thủy phân mới có hoạt tính kháng khuẩn từ quần thể vi sinh vật liên kết hải miên biển. Có thể thấy, vi sinh vật liên kết hải miên là nguồn giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học, một trong số đó là hoạt tính kháng khuẩn [13, 18, 20]. Trong nghiên cứu này, số chủng vi khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng

Vibrio spp. trên tổng số chủng phân lập khá nhỏ, chưa tới 1%.

Định danh một số chủng vi khuẩn phân lập liên kết hải miên

Các chủng vi khuẩn có khả năng ức chế đồng thời cả 2 nguồn bệnh *Vibrio* cũng như những chủng tạo vòng kháng khuẩn lớn hơn 10 mm được định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Cặp mỗi đặc hiệu cho gen 16S rRNA cho sản phẩm PCR khoảng 1500 bp. Sau khi tiến hành PCR, sản phẩm PCR được tách dòng vào vector pCR2.1 và giải trình tự. So sánh trình tự nucleotides nhận được với các trình tự gen 16S rRNA vi khuẩn trong Ngân hàng Gen thế giới bằng phần mềm BLASTn để nhận dạng các chủng vi khuẩn nghiên cứu (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả định danh một số chủng vi khuẩn phân lập đối kháng *Vibrio* spp.

| Ký hiệu | Từ hải miên | Tên khoa học | Trình tự tham chiếu |
|---------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| LC03cs2 | <i>Haliclona oculata</i> | <i>Bacillus megaterium</i> | KF717520.1 |
| LC22cs2 | <i>Dycidea cinerea</i> | <i>Bacillus altitudinis</i> | KF032700.1 |
| LC22cs5 | <i>Dycidea cinerea</i> | <i>Bacillus mycooides</i> | KF054993.1 |
| LC25cs2 | <i>Cliona viridis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | JQ302302.1 |
| LC25cs5 | <i>Cliona viridis</i> | <i>Paenibacillus barengoltzii</i> | GQ284351.1 |
| LC27cs1 | <i>Agelas dirpar</i> | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | JX015364.1 |
| LC27cs2 | <i>Agelas dirpar</i> | <i>Bacillus axarquiensis</i> | KC915228.1 |
| LC27b1 | <i>Agelas dirpar</i> | <i>Bacillus pumilus</i> | KC596003.1 |

Bảng 3 cho thấy, các chủng vi khuẩn phân lập được phần lớn thuộc chi *Bacillus*, đây cũng là chi vi khuẩn được biết có nhiều loài có hoạt tính kháng khuẩn. Nhiều chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* liên kết hải miên biển có hoạt tính sinh học đã được phân lập, nhận dạng và xác định các hợp chất hoạt tính sinh học của chúng đã được báo cáo [3, 5, 21]. Các chủng *B. megaterium* (LC03cs2), *B. mycooides* (LC22cs5) và *B. subtilis* (LC25cs2) thể hiện hoạt tính đối kháng cả 2 loài *Vibrio* nghiên cứu. Đây cũng là những loài *Bacillus* đã được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp cũng như trong công nghệ enzyme, đặc biệt là 2 loài *Bacillus megaterium* và *B. subtilis*.

KẾT LUẬN

Sử dụng môi trường đặc hiệu cho vi khuẩn biển (marine agar) đã phân lập và xác định mật độ vi khuẩn nuôi cấy được liên kết 6 loài hải miên vùng biển Sơn Chà. Các loài hải miên

khác nhau có mật độ vi khuẩn liên kết khác nhau, trong đó hải miên *Callyspongia australis* (LC26) có mật độ vi khuẩn liên kết nhiều nhất (820 CFU/g), tiếp đến là *Cliona viridis* (LC25) với 560 CFU/g. Hải miên *Agelas dirpar* (LC27) có mật độ vi khuẩn liên kết nuôi cấy được thấp nhất trong số 6 loài hải miên nghiên cứu (150 CFU/g). Đã đánh giá hoạt tính đối kháng *Vibrio* spp. của 17 chủng vi khuẩn phân lập, trong đó 3 chủng (LC03cs2, LC22cs5 và LC25cs2) có khả năng ức chế sinh trưởng của cả *Vibrio parahaemolyticus* và *V. vulnificus* với đường kính vòng ức chế dao động từ 5,3-15,3 mm. Trong số 8 chủng vi khuẩn tuyển chọn (LC03cs2, LC22cs2, LC22cs5, LC25cs2, LC25cs5, LC27cs1, LC27cs2, LC27b1) được định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA, 7 chủng (LC03cs2, LC22cs2, LC22cs5, LC25cs2, LC27cs1, LC27cs2, LC27b1) thuộc chi *Bacillus* và chỉ có 1 chủng

(LC25cs5) là *Paenibacillus barengoltzii* được phân lập từ hải miên *Cliona viridis*.

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thành với sự hỗ trợ về kinh phí của Đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số VAST 06.04/13-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Azzini F., Calcinai B., Cerrano C., Bavestrello G., Pansini M., 2007. Sponges of the marine karst lakes and of the coast of the islands of Ha Long Bay (North Vietnam). *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*: 157- 164.
2. Calcinai B., Azzini F., Bavestrello G., Cerrano C., Pansini M., Do Cong Thung, 2006. Boring sponges from Ha Long Bay, Tonkin Gulf, Vietnam. *Zoological studies*, 45(2): 201-212.
3. Brammavidhya S., Usharani G., 2013. Bioactive potential of sponge associated *Bacillus cereus* SBS02 isolated from *Hyattella cribriformis*. *Inter. J. Res. in Environ. Sci. Technol.*, 3(2): 61-64.
4. Đỗ Mạnh Hào, Phạm Thế Thư, 2010. Một số kết quả nghiên cứu về vi sinh vật tại vùng ven biển Hải Phòng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển*, 10(1): 51-65.
5. Krishna E. R., Kumar P. S., Sekhar M. D. A. G. C., Kumar B. V., 2011. Study on marine sponge isolated bacteria *Bacillus subtilis* (MTCC No. 10619) producing amylase and protease enzymes. *J. Pharmacy Res.*, 4(11): 3925-3927.
6. Kumar C. P., John B. A., Khan S. A., Lyla P. S., Kamaruzzaman B. Y., Jalal K. C. A., 2013. Cultivable marine bacterial isolates from a sponge *Hyattella cribriformis*. *J. Biol. Sci.*, 13(1): 26-32.
7. Lee O. O., Wong Y. H., Qian P. Y., 2009. Inter- and intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from San Juan island, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(11): 3513-3521.
8. Li Z.-Y., He L.-M., Wu J., Jiang Q., 2006. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *J. Experimental Marine Biol. Ecol.*, 329: 75-85.
9. Nguyen Huu Tung, Chau Van Minh, Tran Thu Ha, Phan Van Kiem, Hoang Thanh Huong, Nguyen Tien Dat, Nguyen Xuan Nhiem, Bui Huu Tai, Jae-Hee Hyun, Hee-Kyoung Kang, Young Ho Kim, 2009. C29-Sterols with a cyclopropane ring at C-25 and 26 from the Vietnamese marine sponge *Ianthella* sp. and their anticancer properties. *Bioorganic & Medicinal Chem. Letter*, DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.06.097
10. Nguyen Xuan Cuong, Arlette Longeon, Van Cuong Pham, Félix Urvois, Christine Bressy, Thi Thanh Van Trinh, Hoai Nam Nguyen, Van Kiem Phan, Van Minh Chau, Jean-François Briand, Marie-Lise Bourguet-Kondracki, 2013. Antifouling 26,27-Cyclosterols from the Vietnamese marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *J. Nat. Prod.*, 76(7): 1313-1318 .
11. Penesyan A., Tebben J., Lee M., Thomas T., Kjelleberg S., Harder T., Egan S., 2011. Identification of the antibacterial compound produced by the marine epiphytic bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and related sponge-associated bacteria. *Mar. Drugs*, 9: 1391-1402.
12. Radjasa O. K., 2007. Antibacterial activity of sponge associated bacteria isolated from north java sea. *J. Coastal Development*, 10(3): 143-150.
13. Radjasa O. K., Sabdono A., Junaidi and Zocchi E., 2007. Richness of secondary metabolites-producing marine bacteria associated with sponge *Haliclona* sp. *Inter. J. Pharmacology*, 3(3): 275-279.
14. Sambrook J., Russell D. W., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Third edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 2344 pp.
15. Schmitt S., Peter Tsai, James Bell, Jane Fromont, Micha Ilan, Niels Lindquist, Thierry Perez, Allen Rodrigo, Peter J

- Schupp, Jean Vacelet, Nicole Webster, Ute Hentschel, Michael W Taylor, 2012. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges *The ISME Journal*, 6: 564-576.
16. Sipkema D., Schippers K., Maalcke W. J., Yang Y., Salim S., Blanch H. W., 2011. Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona (gellius)* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(6): 2130-2140.
 17. Thi Tuyen Do, Dinh Quyen Le, Dinh Thi Quyen, Van Cuong Pham, 2012. Isolation and identification of marine bacteria from marine mud in Vietnam with antimicrobial activity. *J. Viet. Env.*, 3(2): 71-75.
 18. Thomas T. R. A., Kavlekar D. P., LokaBharathi P. A., 2010. Marine drugs from sponge-microbe association - A Review. *Mar. Drugs*, 8: 1417-1468.
 19. Yung P. Y., Burke C., Lewis M., Kjelleberg S., Thomas T., 2011. Novel antibacterial proteins from the microbial communities associated with the sponge *Cymbastela concentrica* and the green alga *Ulva australis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(4): 1512.
 20. Wang G., 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 545-551.
 21. Zhang H., Zhang F., Li Z., 2009. Gene analysis, optimized production and property of marine lipase from *Bacillus pumilus* B106 associated with South China Sea sponge *Halichondria rugosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 1267-1274.

ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF SOME SPONGE - ASSOCIATED BACTERIAL ISOLATES FROM SIX MARINE SPONGE SPECIES OF SON CHA COAST

Pham Viet Cuong, Nguyen Mai Anh, Vu Thi Quyen, Nguyen Thi Kim Cuc

Institute of Marine biochemistry

SUMMARY

Sponges are known to be a host of diverse microbial community. By culture – dependent method, 2640 sponge - associated bacterial strains from 6 sponge species of Son Cha peninsula have been isolated. The number of bacterial isolates from the sponge *Cliona viridis* (LC25) and *Callyspongia australis* (LC26) was higher than that from the other sponge samples. The sponge *Agelas dirpar* (LC27) had the least number of isolated bacteria. The anti-vibrio activity of 17 chosen isolates had been examined by well diffusion method. Among 17 tested isolates, only 3 isolates demonstrated growth inhibition activity against both *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. Isolate LC27cs1 had strongest inhibitory effect against *V. parahaemolyticus* with zone of clearance of 21.3 mm. By 16S rRNA gene sequencing method, 3 isolates showing antibacterial activity against both *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* and 5 others that have inhibition zone more than 10 mm have been identified. Most of isolates belong to *Bacillus* genus (7/8 isolates) and only one isolate LC25cs5 from sponge *Cliona viridis* was identified to *Paenibacillus barengoltzii*.

Keywords: *Bacillus*, *Vibrio*, 16S rRNA, marine sponge, Son Cha.

Ngày nhận bài: 21-12-2013