

PHÂN LẬP CÁC CHỦNG *BACILLUS* CÓ HOẠT TÍNH TẠO MÀNG SINH VẬT (BIOFILM) VÀ TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN CỦA CHÚNG

Nguyễn Quang Huy*, Trần Thúy Hằng

Trường đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội; (*)huynq17@gmail.com

TÓM TẮT: Màng sinh vật (biofilm) là một tập hợp gồm nhiều tế bào vi sinh vật gắn kết với nhau trên bề mặt một giá thể. Từ mẫu đất, nước, bùn thu thập tại các khu đất nông nghiệp, làng nghề ở Hà Nội và Hưng Yên chúng tôi đã phân lập được một số chủng vi khuẩn có khả năng tạo biofilm bằng phương pháp sử dụng tím tinh thể. Trong số các chủng phân lập, hai chủng U1.3 và U3.7 có khả năng tạo biofilm mạnh nhất. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử cho thấy, cả hai chủng đều có hình dạng que, gram (+) và mang nhiều đặc điểm giống với các đặc điểm hình thái với chi *Bacillus*. Bằng phương pháp giải trình tự và so sánh gen mã hoá 16S rARN cho thấy, đoạn gen mã hóa tương ứng của chủng U1.3 tương đồng 99,9% với đoạn gen 16S rARN của *Bacillus subtilis*_AB042061 còn U3.7 tương đồng 99,5% so với đoạn gen 16S rARN của *Bacillus velezensis*_AY603658. Cả hai chủng này đều phát triển và tạo biofilm tốt ở nhiệt độ 37°C và pH từ 6,5 tới 7,5. Các chủng này, ngoài khả năng tạo biofilm, còn có khả năng kháng khuẩn với một số chủng vi sinh vật gây hại như *Phytophthora* sp., *E. coli* hay *Ralstonia* sp.

Từ khóa: 16S rARN, *Bacillus*, kháng khuẩn, màng sinh vật, phân lập.

MỞ ĐẦU

Màng sinh vật (biofilm) là một tập hợp gồm nhiều tế bào vi sinh vật gắn kết với nhau trên bề mặt một giá thể. Biofilm có thể được hình thành từ một hay nhiều chủng vi sinh vật có thể cùng loài hay khác loài. Theo các nghiên cứu của Davey và O'Toole (2000), Kokare et al. (2009) [4, 6] nhiều loài vi sinh vật bao gồm cả vi khuẩn gram (+) (*Streptococcus* sp., *Bacillus subtilis*...) và Gram (-) (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*...) có khả năng sinh trưởng tạo biofilm. Biofilm có thể được tạo ra ở trên bề mặt của nhiều loại vật liệu khác nhau như nhựa, kim loại, kính, gỗ... Nghiên cứu của Morikawa (2006) [8] chỉ ra rằng biofilm có vai trò bảo vệ các loài vi sinh vật chống lại tác động của các yếu tố bất lợi của môi trường sống như thiếu các chất dinh dưỡng, tác dụng của chất kháng sinh... Các tế bào vi sinh vật sống trong biofilm khi liên kết với nhau có khả năng chống chịu cao với các chất kháng khuẩn, điều kiện bất lợi của môi trường như nhiệt độ, độ ẩm tốt hơn so với tế bào sống tự do.

Theo Costerton et al. (2003) [3] việc nghiên cứu mô hình tạo biofilm không những giúp cho việc tìm hiểu sâu hơn về cơ chế tồn tại, phát triển cũng như tương tác của vi sinh vật trong điều kiện tự nhiên mà còn từ đó giúp chúng ta kiểm soát tốt hơn sự phát triển của vi sinh vật nhằm các mục đích nghiên cứu và ứng dụng

trong các ngành nông nghiệp, y học, môi trường... Hiện nay, việc ứng dụng phát triển các loài vi sinh vật có hoạt tính sinh học đồng thời có khả năng tạo biofilm đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học, các công ty sản xuất. Trong khi rất nhiều loài có hoạt tính tạo biofilm đều có hại như *Streptococcus mutans* tạo mảng bám răng gây bệnh sâu răng, *Pseudomonas aeruginosa* gây các bệnh mù xanh thì các chủng thuộc chi *Bacillus*, là các chủng có ích, đồng thời có hoạt tính tạo biofilm. Các nghiên cứu của Asajia & Shoda (1996), Bais et al. (2004) và Lemn et al. (2008) [1, 2, 7] đã đề cập đến việc phân lập, tuyển chọn các chủng *Bacillus* có hoạt tính tạo biofilm. Thí nghiệm với rễ cây *Arabidopsis* cho thấy việc sử dụng chủng *B. subtilis* 6051 có hoạt tính tạo biofilm đồng thời tổng hợp surfactin làm tăng khả năng hấp thu của rễ cây. Việc có mặt của surfactin trong biofilm còn ức chế sự phát triển của *Salmonella enterica* ở nồng độ 50 µg/ml và *E. coli* và *Proteus mirabilis* ở mức cao hơn trong điều kiện *in vitro* [8]. Chất surfactin từ chủng *B. subtilis* có tác dụng cao hơn cả iturin A trong việc kháng lại các nấm gây bệnh thực vật và nấm sinh độc tố aflatoxin. Một số sản phẩm thương mại như surfactin, serenade được tổng hợp từ *B. subtilis* có khả năng tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh thực vật như *Erwinia*, *Pseudomonas* hay *Xanthomonas* trong công

trình công bố của Bais et al. (2004), Kokare et al. (2009) [2, 6]. Các sản phẩm này được hình thành từ các chủng thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính tạo biofilm. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, biofilm từ *Bacillus* còn có tác dụng chống lại sự ăn mòn kim loại trong tự nhiên do nhóm vi khuẩn kỵ khí khử sunfat gây nên. Vi khuẩn khử sunfat ăn mòn kim loại làm thiệt hại cho kinh tế của Hoa Kỳ từ 4 đến 6 tỷ đô la mỗi năm. Hợp chất gramicidin-S từ *Bacillus brevis* 18.3-một chủng có hoạt tính tạo biofilm làm giảm tỷ lệ ăn mòn kim loại do ức chế sự phát triển của vi khuẩn khử sunfat *D. orientis* và vi khuẩn oxi hóa *L. discophora* SP6. Theo Morrikawa (2006) [8] việc hình thành biofilm chủng *Bacillus* này đã làm giảm khả năng kim loại bị ăn mòn thấp hơn 4 lần.

Ở Việt Nam các công trình nghiên cứu, phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng tạo màng sinh vật còn thiếu cả về số lượng và chất lượng. Các công trình công bố gần đây của Nguyen et al. (2011), Tran & Nguyen (2011) [9, 12] mới chỉ dừng ở việc phân lập các chủng có hoạt tính tạo biofilm mà chưa có nhiều kết quả nghiên cứu ứng dụng. Nghiên cứu phân lập *Bacillus* từ các vùng sinh thái, ô nhiễm khác nhau tương tự như nghiên cứu của Ngô Tự Thành và nnk. (2007) [10] chưa nhiều. Nội dung nghiên cứu của bài báo này trình bày các kết quả trong việc phân lập các chủng *Bacillus* có hoạt tính tạo biofilm, đồng thời bước đầu tìm hiểu khả năng kháng khuẩn từ chúng.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Các mẫu đất, nước, bùn thu thập từ các mẫu đất nông nghiệp trồng các loại cây khác nhau (cải ngọt, họ, đậu cove...) ở ngoại thành Hà Nội; các mẫu nước, bùn ô nhiễm được lấy từ các làng nghề tại Hà Nội và Hưng Yên. Các mẫu sau khi thu thập được vận chuyển và phân tích trong vòng 24 giờ.

Các chủng *E. coli*, *Ralstonia* sp., *Phytophthora* sp., *Samonella* sp. là các chủng vi khuẩn được cung cấp bởi Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Các hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu đều đạt các tiêu chuẩn về phân tích hóa sinh, vi

sinh và sinh học phân tử.

Phương pháp

Môi trường phân lập vi sinh vật gồm môi trường khoáng bao gồm 7 g K_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 0,1 g $MgSO_4.7H_2O$; 0,01 g $CaCl_2$; 0,001 g $FeSO_4$; 0,1 g $NaCl$; 1 g glucose và 0,2 g cao nấm men trong 1 lít nước; môi trường Luria Betani (LB) bao gồm 10 g tryptone, 5 g cao nấm men và 10 g $NaCl$ trong một 1 lít nước. Môi trường thạch bao gồm 2% thạch được bổ sung vào môi trường LB. Các môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút.

Sự hình thành biofilm của các chủng vi khuẩn được đánh giá qua phương pháp nhuộm bằng tím tinh thể (crystal violet) theo O'Toole et al. (2000) [11]. Các chủng vi khuẩn được nuôi lắc (160 vòng/phút) trong môi trường LB trong 24 giờ ở 37°C. Sau đó, dịch nuôi cấy được đưa vào các ống eppendorf bổ sung thêm môi trường LB nuôi qua đêm. Môi trường, nuôi cấy được loại bỏ còn tế bào bám trên eppendorf được nhuộm với tím tinh thể 1%. Lượng tế bào không tham gia tạo biofilm trong ống ly tâm được đánh giá bằng đo mật độ quang ở bước sóng 620 nm. Mật độ tế bào trong biofilm được đánh giá bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 570 nm sau khi đã nhuộm bằng tím tinh thể. Đánh giá khả năng phát triển của vi khuẩn trong môi trường khoáng có bổ sung các nguồn cacbon hoặc nitơ khác nhau được thực hiện bằng cách đo mật độ quang học ở bước sóng 660 nm.

Phương pháp phân loại vi sinh vật được tiến hành bằng quan sát hình thái khuẩn lạc, tế bào qua kính hiển vi điện tử và quang học, kết hợp với phân tích các đặc điểm sinh lý sinh hóa. Trình tự 16S rARN của các chủng vi khuẩn phân lập được đọc trực tiếp trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant (Hoa Kỳ). Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự 16S rARN các loài đã có trong ngân hàng gen quốc tế để xác định đến tên loài. Chụp ảnh kính hiển vi điện tử được thực hiện tại Trung tâm Khoa học Vật liệu, trường đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG HN.

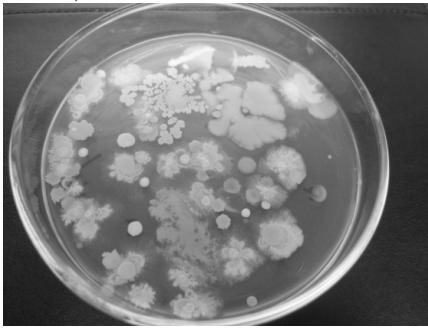
Đánh giá khả năng kháng khuẩn được thực hiện bằng phương pháp đo đường kính vòng vô

khuẩn sau khi các vòng được quan sát rõ và chụp ảnh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập các chủng vi sinh vật có hoạt tính tạo biofilm

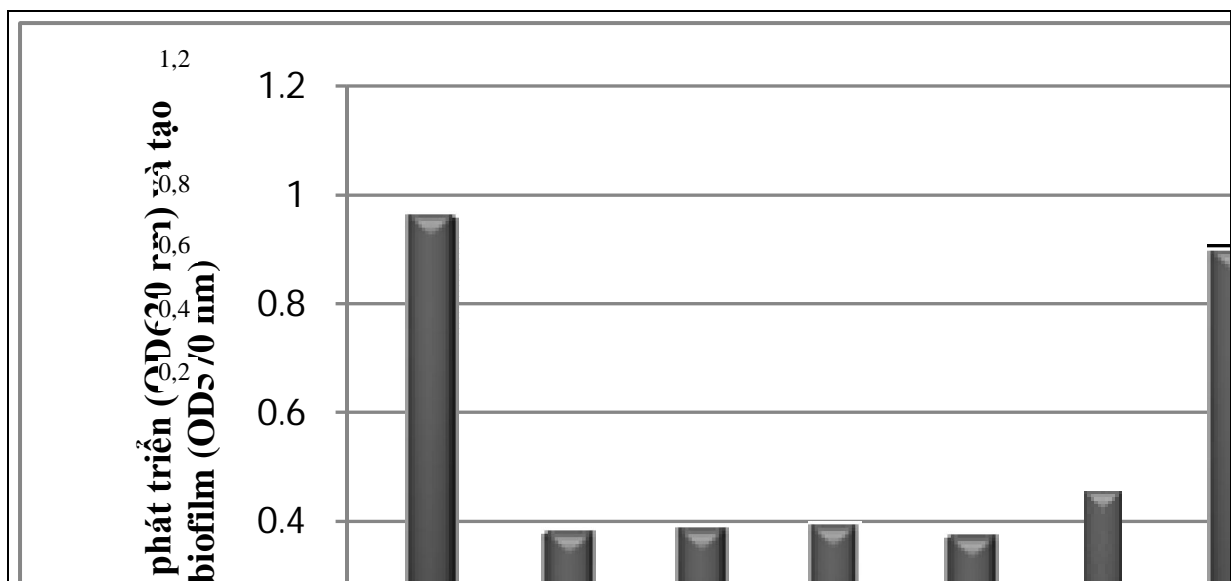
Kết quả phân lập từ các mẫu đất, mẫu nước, bùn tại khu vực ô nhiễm cũng như đất nông nghiệp trồng hoa màu cho thấy, số lượng vi sinh vật phát triển sau một ngày nuôi cấy ở mẫu đất và rễ cây nhiều hơn ở các mẫu nước thải. Điều này có thể lý giải nguyên nhân trong nước thải ô nhiễm có nhiều chất độc ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Tuy nhiên, trong các mẫu phân lập, số lượng vi sinh vật cũng khá đa dạng. Trên môi trường LB giàu dinh dưỡng có thể phân lập nhiều chủng vi khuẩn, nấm có hình thái khác nhau (hình 1).



Hình 1. Khuẩn lạc các chủng vi sinh vật phân lập từ rễ cây trên môi trường LB

Điều đáng lưu ý là ở mẫu rễ cây, mặc dù đã trải qua một số bước xử lý bao gồm việc rửa sạch bằng nước cất vô trùng để loại bỏ các hạt đất bám dính, sóng siêu âm để loại bỏ các tế bào vi sinh vật bám dính trên bề mặt rễ cây, nhưng sau 1 ngày nuôi cấy trên môi trường LB đặc từ bề mặt rễ cây vẫn có sự phát triển của vi khuẩn mọc tỏa ra theo dạng hình nhánh (hình 1). Điều này chứng tỏ, có những chủng vi khuẩn bám dính rất chặt với bề mặt rễ cây và hứa hẹn là những chủng có hoạt tính tạo biofilm mạnh [5].

Từ các mẫu thu thập, chúng tôi phân lập được 11 chủng vi khuẩn có hoạt tính tạo biofilm mạnh (hình 2). So sánh kết quả OD 620 nm (đánh giá số lượng tế bào sống tự do) và OD 570 nm sau khi nhuộm tím kết tinh (đánh giá số lượng tế bào liên kết) nhận thấy, số lượng tế bào tự do trong môi trường của các chủng tạo biofilm thấp hơn nhiều so với số lượng tế bào liên kết. Điều này chứng tỏ phần lớn các tế bào của 11 chủng trên đã chuyển từ dạng sống tự do trôi nổi sang dạng liên kết tạo biofilm. Chúng tôi cũng nhận thấy là những chủng có hoạt tính tổng hợp biofilm mạnh thì số lượng tế bào tự do trong môi trường thấp và ngược lại. Kết quả trên hình 2 cho thấy, trong số các chủng vi sinh vật phân lập có hoạt tính tạo biofilm, hai chủng vi khuẩn ký hiệu U1.3 và U3.7 có hoạt tính cao nhất, vì vậy, hai chủng này được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Khả năng tạo biofilm từ một số chủng vi sinh vật phân lập

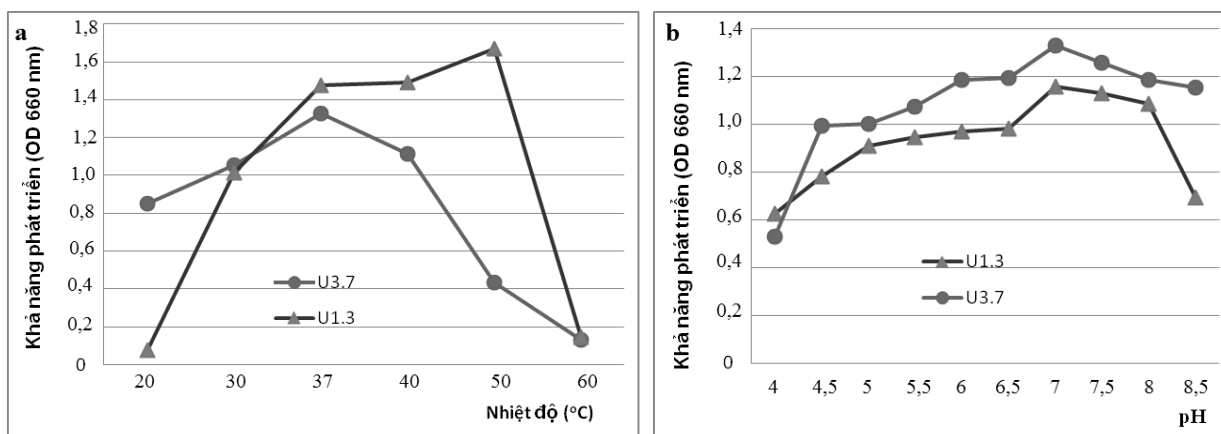
trắng, bề mặt khuẩn lạc hơi nhăn nheo. Khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử biofilm hình thành từ hai chủng vi khuẩn này, chúng tôi nhận thấy chúng có khả năng hình thành các mạng lưới liên kết với nhau rất chặt chẽ (hình 3). Việc hình thành mạng lưới này giống như các kết quả nghiên cứu trước đây của Tran & Nguyen (2011) [12] về các chủng thuộc chi *Bacillus* phân lập ở Việt Nam.

Để xác định phân loại chính xác hai chủng vi khuẩn phân lập chúng tôi tiến hành giải trình tự gen 16S rARN. Kết quả cho thấy, trình tự gen 16S rARN của chủng U1.3 tương đồng 99,9% (1348/1350 bp) với đoạn 16S rARN của vi khuẩn *Bacillus subtilis* subsp *spizizenii*_AF074970; tương đồng 99,8% (1347/1350 bp) với *Bacillus subtilis*_AB042061. Trình tự gen 16S rARN của chủng U3.7 tương đồng 99,8% (1347/1350 bp) với đoạn 16S rARN của vi khuẩn *Bacillus velezensis*_AY603658; tương đồng 99,5% (1343/1350 bp) với *Bacillus*

*nematocita*_AY820954. Những kết quả phân tích dựa vào trình tự gen 16S rARN cho thấy, cả hai chủng U1.3 và U3.7 đều thuộc chi *Bacillus*, từ đó U1.3 có quan hệ gần với *B. Subtilis*, còn U3.7 gần với loài *Bacillus velezensis* (hình 4).

Các kết quả nghiên cứu của Tran & Nguyen (2011) [12] đã phân lập được hai chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* là *Bacillus sonorensis* và *Bacillus aerius* có hoạt tính tạo biofilm. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu phân lập chủng U1.3 và U3.7 có ý nghĩa là những đóng góp mới về tính đa dạng của các loài thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính tạo biofilm phân lập trong các điều kiện sinh thái khác nhau ở Việt Nam.

Các nghiên cứu về nhiệt độ tối ưu cho thấy, cả hai chủng đều phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ từ 30 đến 40°C, tuy nhiên, chủng U1.3 có thể phát triển ở nhiệt độ cao trên 45°C (hình 5a). Cả hai chủng đều phát triển trong điều kiện pH môi trường từ 6,5 đến 7,5 (hình 5b). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với điều kiện môi trường phân lập được các chủng vi khuẩn này.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ (a) và pH (b) đến sự phát triển của hai chủng phân lập

Ảnh hưởng điều kiện môi trường đến việc tạo biofilm của hai chủng *Bacillus*

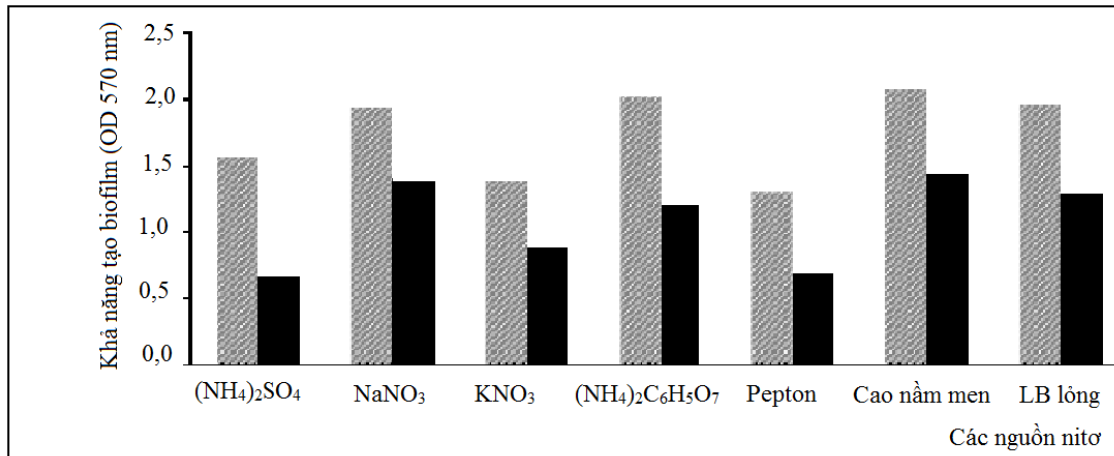
Theo nghiên cứu của Kearns et al. (2005) [5] việc hình thành biofilm từ các chủng *Bacillus* liên quan mật thiết đến thành phần và tính chất nguồn nitơ và cacbon có trong môi trường nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong môi trường khoáng bổ sung các nguồn nitơ khác nhau cả hai chủng *Bacillus* phân lập đều có khả năng sử dụng để phát triển và hình thành biofilm. Chủng U1.3 có khả năng tạo

biofilm tốt trong các môi trường có bổ sung các nguồn nitơ khác nhau, tuy nhiên, với nguồn nitơ là pepton hoạt tính tạo biofilm của chủng U1.3 là thấp nhất trong khi với môi trường bổ sung cao nấm men cho kết quả ngược lại. Chủng U3.7 có hoạt tính tạo biofilm yếu hơn so với chủng U1.3 trong môi trường khoáng bổ sung các nguồn nitơ tương ứng. Khả năng tạo biofilm cao nhất ở chủng U3.7 thể hiện ở môi trường có bổ sung NaNO_3 hoặc cao nấm men (hình 6).

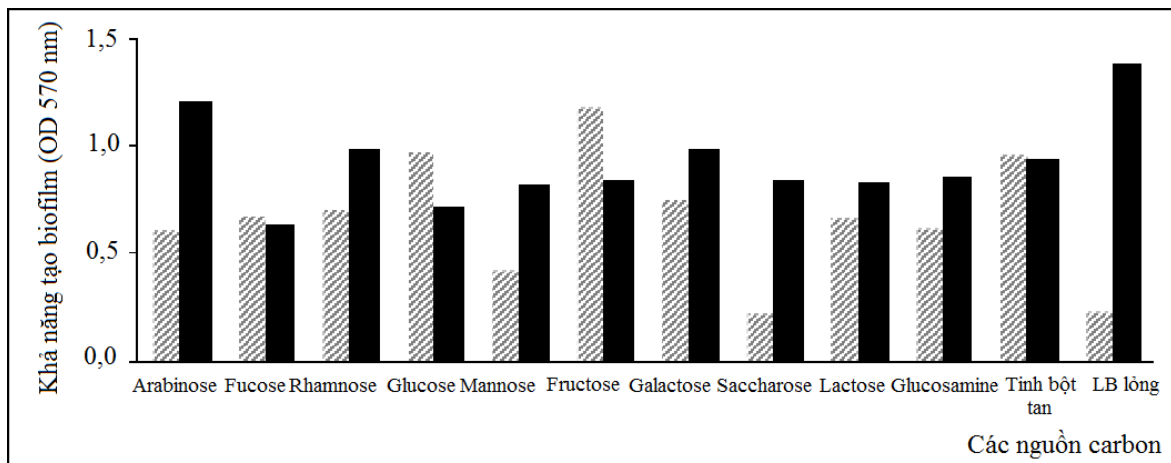
Cả hai chủng vi khuẩn phân lập U1.3 và

U3.7 đều sử dụng các nguồn cacbon khác nhau trong việc hình thành biofilm (hình 7). Tuy nhiên, việc có đầy đủ các chất dinh dưỡng trong môi trường LB giúp cho chủng U3.7 phát triển

tạo biofilm cao nhất nhưng lại có tác dụng ngược lại với chủng U1.3. Chủng U1.3 tạo biofilm mạnh trong môi trường khoáng bổ sung fructose.



Hình 6. Khả năng sử dụng các nguồn nitơ trong việc tạo biofilm của hai chủng phân lập (■. chủng U3.7; ▨. chủng U1.3)



Hình 7. Khả năng sử dụng các nguồn cacbon trong việc tạo biofilm của hai chủng phân lập (■. chủng U3.7; ▨. chủng U1.3)

Bảng 1. Hoạt tính kháng khuẩn của hai chủng vi khuẩn phân lập

Ký hiệu chủng	Hoạt tính kháng khuẩn (đường kính vòng vô khuẩn: cm)			
	<i>E. coli</i>	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>Samonella</i> sp.	<i>Ralstonia</i> sp.
U1.3	7	9	2	3
U3.7	3	2	7	7

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn phân lập

Bước đầu đánh giá khả năng kháng khuẩn của 2 chủng thuộc chi *Bacillus* được phân lập,

chúng tôi đã sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, đánh giá hoạt tính qua vòng vô khuẩn. Kết quả sau 7 ngày nuôi cấy cho thấy, bước đầu các chủng này đều có hoạt tính kháng

khuẩn. Trong khi chủng U1.3 có hoạt tính mạnh đối với *E. coli* và *Phytophthora* sp., còn U3.7 có hoạt tính mạnh đối với *Samonella* sp. và *Ralstonia* sp. (bảng 1). Các công trình nghiên cứu trước đây của Asaja & Shoda (1996) [1] hay Bais et al. (2004) [2] cho thấy, một số chủng thuộc chi *Bacillus* như chủng *Bacillus subtilis* RB14 có khả năng tạo biofilm và kháng *Rhizoctonia solani* gây bệnh trên cây cà chua, tuy nhiên, với các chủng vi khuẩn gây hại khác hiện chưa có nhiều kết quả nghiên cứu tương tự.

Trên đây là những kết quả nghiên cứu đầu tiên về khả năng kháng khuẩn từ các chủng có hoạt tính tạo biofilm ở Việt Nam, cần phải có thêm các kết quả nghiên cứu tối ưu cho kháng khuẩn hay sự ức chế phát triển vi khuẩn gây hại từ các chủng phân lập.

KẾT LUẬN

Đã phân lập hai chủng vi khuẩn ký hiệu U1.3 và U3.7 có khả năng tạo biofilm. Cả hai chủng vi khuẩn đều có khả năng tạo biofilm trong môi trường khoáng được bổ sung các nguồn nitơ và cacbon khác nhau.

Dựa vào đặc điểm hình thái và kết quả phân tích trình tự gen 16S rARN cho thấy cả hai chủng U1.3 và U3.7 đều thuộc chi *Bacillus* trong đó U1.3 gần với loài *Bacillus subtilis* còn chủng U3.7 gần với loài *Bacillus velezensis*.

Hai chủng vi khuẩn phân lập có khả năng ức chế sự phát triển một số vi khuẩn có hại như *E. coli*, *Samonella* sp., *Phytophthora* sp. và *Ralstonia* sp.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành dưới sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài cấp Đại học Quốc gia Hà Nội, mã số QG11.16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asaja O. and Shoda M., 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl Environ Microbiol, 62: 4081-4085.
- Bais H. P., Fall R. and Vivanco J. M., 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol, 134: 307-319.
- Costerton W., Veeh R., Shirliff M., Pasmore M. and Ehrlich G., 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J Clin Invest, 112: 1466-1477.
- Davey M. E. and O'Toole G. A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev, 64: 847-867.
- Kearns D. B., Chu F., Branda S., Kolter R. and Losick R., 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 55: 739-749.
- Kokare C. R., Chakraborty S., Khopade A. N. and Mahadik K. R., 2009. Biofilm: Importance and applications. Ind J Biotechnol., 8: 159-168.
- Lemn K. P., Earl A. M., Vlamakis H. C., Aguilar C. and Kolter R., 2008. Biofilm development with and emphasis on *Bacillus subtilis*. Curr Top Microbiol Immunol, 322: 1-16.
- Morikwa M., 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. J Biosci Bioeng, 101: 1-8.
- Nguyen Q. H., Nguyen T. P. L. and Tran T. H., 2011. Characterization of biofilm-forming bacteria isolated from soil in Vietnam. Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 27(2S): 187-193.
- Ngô Tự Thành., Bùi Thị Việt Hà., Vũ Thị Minh Đức., Chu Văn Mẫn. 2007. Nghiên cứu hoạt tính enzym ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải. Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, 25: 101-106.
- O'Toole G. A., Kaplan H. B. and Kolter R., 2000. Biofilm formation as microbial development. Ann. Rev Microbiol, 54: 49-79.
- Tran T. H. and Nguyen Q. H., 2011. Isolate biofilm forming *Bacillus* strains from contamination site in trade villages in Vietnam. Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 27(2S): 157-162.

ISOLATION OF BIOFILM FORMING *BACILLUS* STRAINS AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Nguyen Quang Huy, Tran Thuy Hang

Hanoi University of Science, VNU

SUMMARY

Biofilms are densely packed multicellular communities of microorganisms attached to a surface or interface. Microorganisms live in a biofilm as the dense and protected environment of the film that allow them to cooperate and interact in various ways. While many make biofilm microbes are harmful, species of the genus *Bacillus* are useful. From soil samples, water contaminated and mud collected in the different locations in Hanoi, Vietnam, we have isolated several microorganisms including bacteria, fungi, actinomyces. Among them two different strains U1.3 and U3.7 are more active in biofilm formation than others based on the violet crystalline method. The data from measurement of absorbability at 570 nm wave length showed U1.3 and U3.7 have higher value (0.95 and 0.89, respectively) compare to others strains (0.58). Based on morphological, biological characteristics and sequences of 16 S rDNA, the two isolated strains were classified as *Bacillus*. The U1.3 and U3.7 strains are similar to *Bacillus subtilis* (AB042061) and *Bacillus velezensis* (AY603658) at 99.9% and 99.5% respectively. Both strains U1.3 and U3.7 were well grown at 37°C and pH from 6.5 to 7.5. Especially strain U3.7 could grow in temperatures above 50°C. Both strains can use different nitrogen and carbon sources for growth and biofilm forming. The data from agar diffusion method showed both strains inhibited the growth of pathogenic microorganisms, such as, *Phytophthora* sp., *E. coli* or *Ralstonia* sp.. This is the first research results on the strains of the genus *Bacillus* that can simultaneously generate biofilm and inhibit the growth of bacteria in Vietnam. The further studies on the biofilm formation and optimum conditions for the efficiency in biocontrol of two *Bacillus* strains are needed.

Keywords: Antibacteria, *Bacillus*, Biofilm, 16S rDNA, isolation.

Ngày nhận bài: 21-11-2011