

**Phân lập, định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* spp.
từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre**

Nguyễn Văn Phúc¹, Phan Thị Phương Trang^{1,2*}

¹Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học; ²Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.

* ptptrang@hcmus.edu.vn

Tóm tắt

Bacillus là nhóm vi khuẩn hiện diện đa số trong các chế phẩm vi sinh dùng cho nuôi trồng thủy hải sản đặc biệt là nuôi tôm. Chúng có thể được phân lập dễ dàng từ trong đất, nước. Tuy nhiên hiện nay các chủng vi sinh vật và chế phẩm vi sinh vật dùng trong nuôi trồng thủy hải sản đều phải nhập ngoại với giá thành rất cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập các chủng *Bacillus* từ chính các mẫu đất, nước và tôm trong các ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre. Các chủng vi sinh vật này được sàng lọc để chọn chủng *Bacillus* an toàn và mang các đặc tính có lợi như: khả năng sinh enzyme ngoại bào cellulase, amylase, protease, lipase và khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh chủ yếu trên tôm. Chủng *Bacillus* tiềm năng được tiến hành định danh và khảo sát biên độ pH, khả năng chịu mặn. Các thông số khảo sát này làm cơ sở cho việc ứng dụng các chủng vi sinh vật này trong việc sản xuất chế phẩm vi sinh.

Từ khóa: *Bacillus*, chế phẩm vi sinh, enzyme ngoại bào, *Vibrio parahaemolyticus*, ao nuôi tôm, tỉnh Bến Tre.

**Isolation, identification and determine the beneficial properties of *Bacillus* spp.
strains from shrimp ponds in Ben Tre province**

Nguyễn Văn Phúc¹; Phan Thị Phương Trang^{1,2*}

¹Center for Bioscience and Biotechnology; ²Laboratory of Molecular Biotechnology, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, Vietnam.

* ptptrang@hcmus.edu.vn

Abstract

Bacillus is a group of bacteria that presents in the majority of biological products for aquaculture, especially for shrimp. They can be easily isolated from soil and water. However, the contemporary strains and microbial products used in aquaculture must be imported with a very high price. In this study, we isolated some *Bacillus* strains from soil,

water and shrimp samples in shrimp ponds of Ben Tre province. Those safe and beneficial strains were screened as having the ability of extracellular enzyme secretion namely cellulase, amylase, protease, lipase and of growth resistance to the pathogen *Vibrio parahaemolyticus* that mainly causes disease on shrimp. Potential *Bacillus* strains were indentical classified and surveyed pH and salinity tolerance. The results of this survey would be the basis for the wide application of this microorganism in the production of biological products.

Keywords: *Bacillus*, biological products, extracellular enzymes, *Vibrio parahaemolyticus*, shrimp ponds, Ben Tre province.

1. Mở đầu

Bến Tre là một trong các tỉnh có diện tích nuôi tôm khá lớn, thống kê lên đến 32.086 ha chiếm 73% tổng diện tích nuôi trồng thủy sản, đạt sản lượng 47.397 tấn vào năm 2013. Tuy nhiên việc nuôi tôm với diện tích lớn và liên tục dẫn đến mất cân bằng sinh thái, ô nhiễm nguồn nước do lượng thức ăn thừa và chất thải từ tôm nuôi dẫn đến tôm nuôi dễ nhiễm các bệnh do virus và vi khuẩn gây ra, làm thiệt hại nặng nề cho người nuôi tôm. Hiện nay chế phẩm vi sinh chứa các vi sinh vật có lợi được dùng như một phương tiện để kiểm soát dịch bệnh bằng cách ức chế, cạnh tranh với những sinh vật có hại, hỗ trợ hệ tiêu hóa, cân bằng vi khuẩn đường ruột [12]. Ngoài ra chế phẩm cũng được dùng trong xử lý ao nuôi bằng cách phân hủy các chất không tiêu hóa được, thức ăn thừa, đặc biệt là rất thân thiện với môi trường [7]. *Bacillus* là nhóm vi khuẩn có mặt chủ yếu trong các chế phẩm vi sinh vì có những đặc tính có lợi như: (i) làm sạch môi trường nhờ khả năng sinh các loại enzyme protease, amylase, cellulase, lipase phân hủy các hợp chất hữu cơ, (ii) kiểm soát sự phát triển quá mức của các vi sinh vật gây bệnh như *Vibrio* do cơ chế cạnh tranh nguồn dinh dưỡng (iii) tiết các chất kháng khuẩn, giữ cho môi trường luôn ở trạng thái cân bằng sinh học [4].

Do đó chúng tôi tiến hành phân lập *Bacillus* từ các ao tôm ở Bến Tre nhằm tuyển chọn những chủng có các đặc tính có lợi để sử dụng trong các chế phẩm vi sinh cho tôm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng *Bacillus* phân lập từ mẫu đất, mẫu nước và mẫu tôm trong các ao tôm ở tỉnh Bến Tre.

Chủng vi sinh vật kiểm định *V. parahaemolyticus* được phân lập từ ao tôm bệnh chết (được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh).

2.1.2. Môi trường sử dụng nghiên cứu

Môi trường LB: tryptone 10 g, cao nấm men 5 g, NaCl 5 g, nước cất vừa đủ 1 lít.

Môi trường kích thích tạo bào tử DSM: KCl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,12 g, NaOH 0,06, pH = 7,6, nước cất vừa đủ 1 lít. Hấp khử trùng ở 121°C, 15 phút. Làm nguội đến 50°C, bổ sung thêm các dung dịch: 1 ml $Ca(NO_3)_2$ (1 M), 1 ml $MnCl_2$ (0,01 M), 1 ml $FeSO_4$ (1 mM).

Môi trường TSA khảo sát đối kháng với *V. parahaemolyticus*: trypticase peptone 15 g, phytone peptone 5 g, NaCl 15 g, nước cất vừa đủ 1 lít.

Môi trường thạch: thành phần như trên có bổ sung thêm 2% agar. Các môi trường trên được hấp khử trùng ở 121°C, 15 phút trước khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và làm thuần

Loại bỏ tế bào sinh dưỡng bằng cách tiến hành gia nhiệt mẫu trong bể ổn nhiệt ở 80°C trong 10 phút. Pha loãng mẫu đến 10^{-2} , hút 100 µl dịch gốc và dịch đã pha loãng trải trên môi trường LB - agar. Ủ ở 37°C trong 24 giờ. Chọn khuẩn lạc đặc trưng cho *Bacillus* và tiến hành làm thuần bằng cách cấy rìa trên môi trường LB - agar, cho tới khi quan sát thấy chỉ có một dạng khuẩn lạc duy nhất trên môi trường [11].

2.2.2. Phương pháp định danh *Bacillus*

Để xác định các chủng vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, một số thử nghiệm cho sàng lọc bước đầu được thực hiện như: nhuộm Gram [2], quan sát hình thái tế bào, nhuộm bào tử [2], thử nghiệm catalase bằng phương pháp sử dụng dung dịch H_2O_2 3%, thử nghiệm oxidase trên đĩa giấy có tấm N-dimethyl-para phenylenediamine, thử nghiệm khả năng di động trên môi trường thạch mềm [3].

Sau bước sàng lọc tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA: tách chiết bộ gen vi khuẩn bằng bộ kit của QIAGEN, khuếch đại trình tự 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự như sau:

27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3').

1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Sản phẩm PCR được tinh chế và gửi giải trình tự. Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu các đặc tính có lợi

Khả năng sinh enzyme ngoại bào: khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào trên môi trường LB – agar có bổ sung cơ chất thích hợp. Tế bào của chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong 24 giờ. Chấm dịch *Bacillus* sau 24 giờ nuôi cấy lên đĩa môi trường LB – agar có bổ sung từng loại cơ chất: 0,5% CMC (carboxy methyl cellulose), 1% tinh bột, 1% gelatin, 1% casein, 1% (v/v) dầu oliu tương ứng cho khảo sát khả năng sinh các enzyme cellulase, amylase, protease và lipase. Ủ các đĩa khảo sát ở 37°C 12 giờ và quan sát vòng phân giải trên đĩa [3].

Khả năng đối kháng với *Vibrio parahaemolyticus*: sử dụng phương pháp cấy vạch thẳng vuông góc (Cross-streak) [8], [9] và phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch [6], [10], để khảo sát đặc tính đối kháng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

2.2.4. Phương pháp khảo sát đặc tính sinh trưởng

Khả năng chịu pH: cấy các chủng *Bacillus* tuyển chọn được trong môi trường LB được điều chỉnh pH bằng HCl và NaOH theo các giá trị pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Nuôi cấy lắc ở 37°C, đo OD_{600 nm} để xác định mật độ vi khuẩn sau 18 giờ [5].

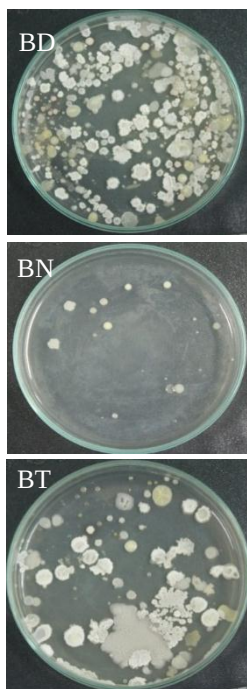
Khả năng chịu mặn: cấy các chủng *Bacillus* tuyển chọn được trong môi trường LB bổ sung thêm NaCl với các nồng độ: 0, 1, 2, 3, 4, 5%. Nuôi cấy lắc ở 37°C, đo OD_{600 nm} để xác định mật độ vi khuẩn sau 18 giờ [5].

Khả năng tương thích giữa các chủng tuyển chọn: sử dụng phương pháp cấy vạch thẳng vuông góc.

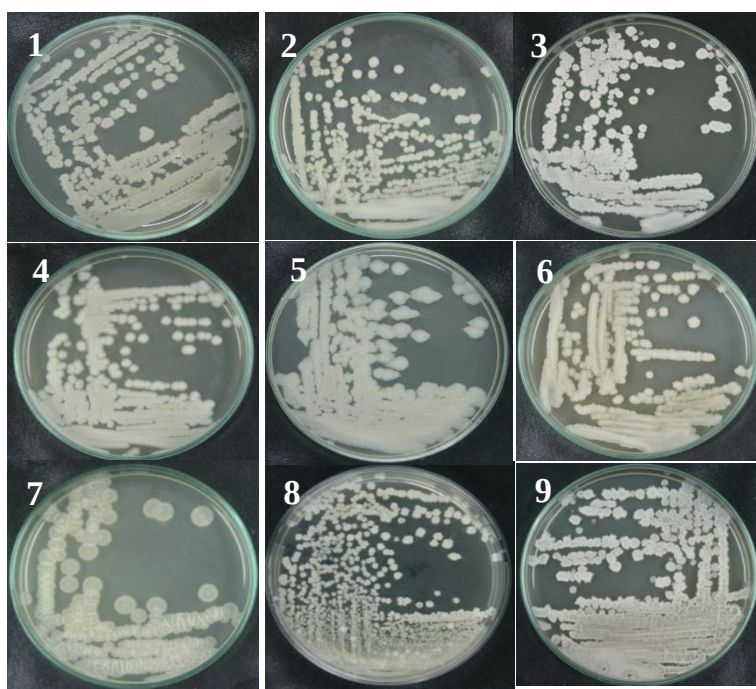
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng *Bacillus*

Từ các mẫu đất, mẫu nước, mẫu tôm có ký hiệu tương ứng là BD, BN, BT lựa chọn được 70 chủng có các đặc điểm hình thái khuẩn lạc giống với *Bacillus* như: khuẩn lạc tròn, rìa răng cưa không đều, màu vàng xám (**Hình 1**). Các chủng này tiếp tục được làm thuần trên môi trường LB – agar và xếp vào 9 dạng khuẩn lạc như **Hình 2**.



Hình 1: Hình dạng các khuẩn lạc phân lập trên môi trường LB



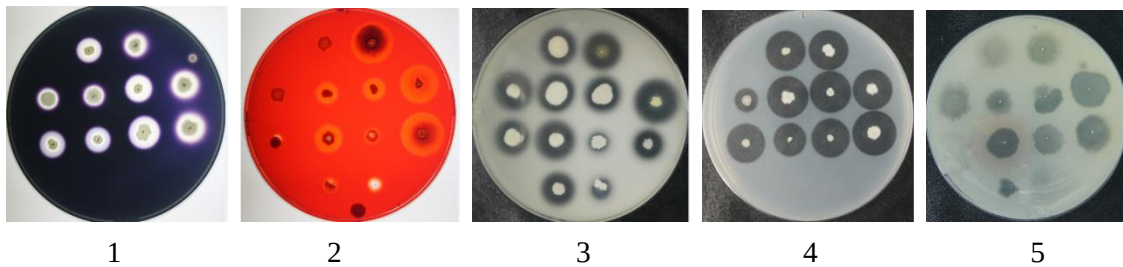
Hình 2: 9 dạng khuẩn lạc đặc trưng được làm thuần trên môi trường LB

Từ 70 chủng có hình dạng đặc trưng của *Bacillus* tiến hành một số thử nghiệm để sàng lọc sơ bộ thông qua các đặc điểm cần thiết của *Bacillus* (tế bào hình que, có sinh bào tử, Gram dương, catalase dương tính, oxidase dương tính và có khả năng di động) chọn được 61 chủng.

3.2. Khảo sát các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* phân lập được

3.2.1. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Các vi sinh vật trong các chế phẩm thường có khả năng tiết các enzyme ngoại bào để phân hủy các chất cặn bã, thức ăn thừa tồn đọng trong ao, hạn chế khả năng gây bệnh của các chủng *Vibrio*. Do vậy các chủng đã được phân lập và sàng lọc sơ bộ sẽ được tiến hành khảo sát khả năng tiết enzyme ngoại bào như amylase, cellulase, protease, lipase trên các đĩa LB – agar có bổ sung cơ chất thích hợp. Sử dụng các thuốc nhuộm lugol, đỏ congo, TCA tương ứng với cơ chất tinh bột, CMC, gelatin để hiện vòng phân giải trên đĩa thạch. Những chủng có khả năng sinh enzyme ngoại bào khi xuất hiện vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc (**Hình 3**).



Hình 3: Vòng phân giải tinh bột (1), cellulose (2), gelatin (3), casein (4), lipase (5) của các chủng *Bacillus* phân lập được.

Đa số các chủng phân lập được đều có khả năng sinh enzyme amylase. Trong đó có 3 chủng BT21.1, BD17, BD22.2 khả năng phân giải tinh bột mạnh nhất với bán kính vòng phân giải lớn nhất 6 mm. Tương tự như vậy, 3 chủng BT21.1, BT22.1, BD23.1 có khả năng sinh enzyme cellulase mạnh với bán kính vòng phân giải là 6,25 – 7 mm.

Tất cả các chủng đều có khả năng tiết gelatinase và caseinase. Trong đó có 5 chủng BT15.2, BT24.2, BT21.2, BT22.2, BD23.1 cho bán kính vòng phân giải gelatin lớn nhất là 7 - 7,75 mm. Và 6 chủng BN12, BD1, BN3, BN5, BN8, BN10 có bán kính vòng phân giải casein lớn nhất là 6,5 – 7 mm.

Riêng khả năng sinh enzyme lipase thấp,

chỉ có 8 chủng có khả năng tiết enzyme lipase nhưng bán kính vòng phân giải chỉ 1 mm.

Từ kết quả trên cho thấy các chủng *Bacillus* phân lập được có khả năng tiết các loại enzyme ngoại bào ở các mức độ khác nhau. Các chủng tiếp tục được khảo sát khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*.

3.2.2. Khả năng đối kháng *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus là vi khuẩn gây bệnh chết sớm trên tôm gây thiệt hại lớn cho ngành nuôi tôm trong cả nước nói chung và tỉnh Bến Tre nói riêng. Do đó tiến hành thí nghiệm khảo sát để tuyển chọn những chủng có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* nhằm hướng tới ứng dụng trong các chế phẩm vi sinh cho tôm. Khảo sát khả năng đối kháng của 61 chủng tuyển chọn bằng phương pháp vạch thẳng vuông góc và đục lỗ thạch.

Với phương pháp vạch thẳng vuông góc chủng có đối kháng khi đường cấy của chủng *V. parahaemolyticus* mọc cách xa đường cấy chủng *Bacillus* khảo sát (**Hình 4A**).

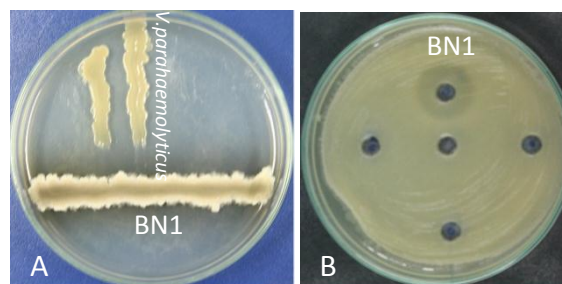
Với phương pháp đục lỗ thạch chủng có đối kháng khi xung quanh lỗ thạch được nhỏ dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* có vòng vô khuẩn (**Hình 4B**).

Kết quả khảo sát trong 61 chủng cho thấy có 5 chủng có đối kháng với *V. parahaemolyticus* là BN1, BT15.3, BT21.1, BT24.2, BD23.1.

Qua kết quả khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào và đối kháng với *V. parahaemolyticus* chọn được 17 chủng trong **Bảng 1**. Có khả năng sinh ít nhất 3 enzyme

Bảng 1: Tổng hợp kết quả vòng phân giải cơ chất của enzyme ngoại bào và đối kháng với *V. parahaemolyticus*.

STT	Kí hiệu chủng	Amylase (mm)	Casein (mm)	Gelatin (mm)	Cellulase (mm)	Lipase (mm)	Đối kháng	
							Vạch thẳng vuông góc (mm)	Đục lỗ thạch (mm)
1	BN12	3	6,5	3,25	3,5	1	0	0
2	BD1	0,5	6,5	6	4,5	0	0	0
3	BN1	1	5	4,5	3,5	1	3	4
4	BN3	4	7	4	3,25	1	0	0
5	BN5	3	6,5	5,5	2	1	0	0
6	BN8	3,5	6,5	4,25	3	0	1	0
7	BN10	2	6,5	6,25	5	0	0	0
8	BT15.2	0	3,75	7,25	0	0	0	0
9	BT15.3	2	3,5	5,5	4,5	1	1	0
10	BT21.1	6	5,5	3	7	0	4	1
11	BT21.2	0,5	0,25	7	0	0	0	0
12	BT22.1	3,5	5,5	1,5	6,25	1	1	0
13	BT22.2	2,25	2,25	7,5	0	0	0	0
14	BT24.2	0	1,5	7,75	0,75	1	2	3
15	BD17	4,5	2,75	4,5	0	0	0	0
16	BD22.2	4,5	3	4	0	0	0	0
17	BD23.1	3	6,25	7	7	1	2	2



Hình 4: Kết quả đối kháng của chủng BN1

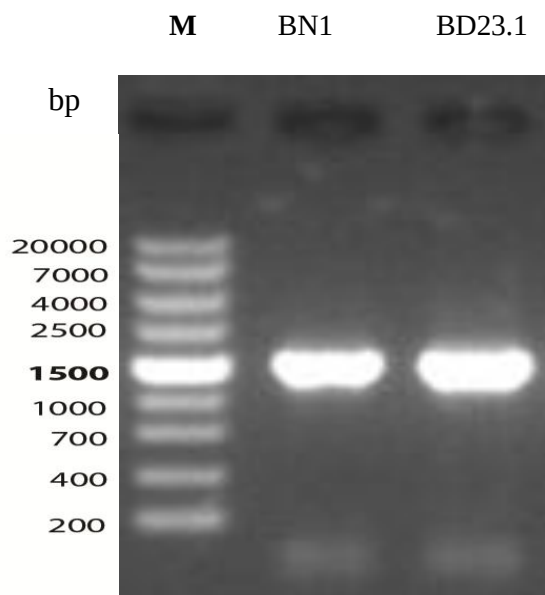
A. Phương pháp vạch thẳng vuông góc

B. Phương pháp đục lỗ thạch

ngoại bào. Trong đó 2 chủng BN1 và BD23.1 được chọn đại diện để định danh đến mức loài bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA. Vì 2 chủng này có khả năng sinh hầu hết các loại enzyme ngoại bào khảo sát và có khả năng đối kháng với *V. parahaemolyticus*.

3.3. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA

Bộ gen của hai chủng tuyển chọn là BN1 và BD23.1 được tách chiết. Trình tự 16S rRNA trên bộ gen được nhân bản bằng phương pháp PCR và chạy điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kết quả (**Hình 5**). Trên **Hình 5** cho thấy ở giếng BN1 và BD23.1 đã thu nhận được đoạn trình tự DNA (~ 1500 bp) mã hóa cho 16S rRNA của 2 chủng BN1 và BD23.1. Vùng trình tự 16S rRNA được giải trình tự và so sánh độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST. Kết quả được trình bày trong **Bảng 2**.



Hình 5: Kết quả điện di trên gel Agarose 1% sản phẩm PCR vùng 16S rRNA chủng BN1 và BD23.1; M: thang DNA.

Bảng 2: Tóm tắt kết quả định danh hai chủng BN1 và BD23.1

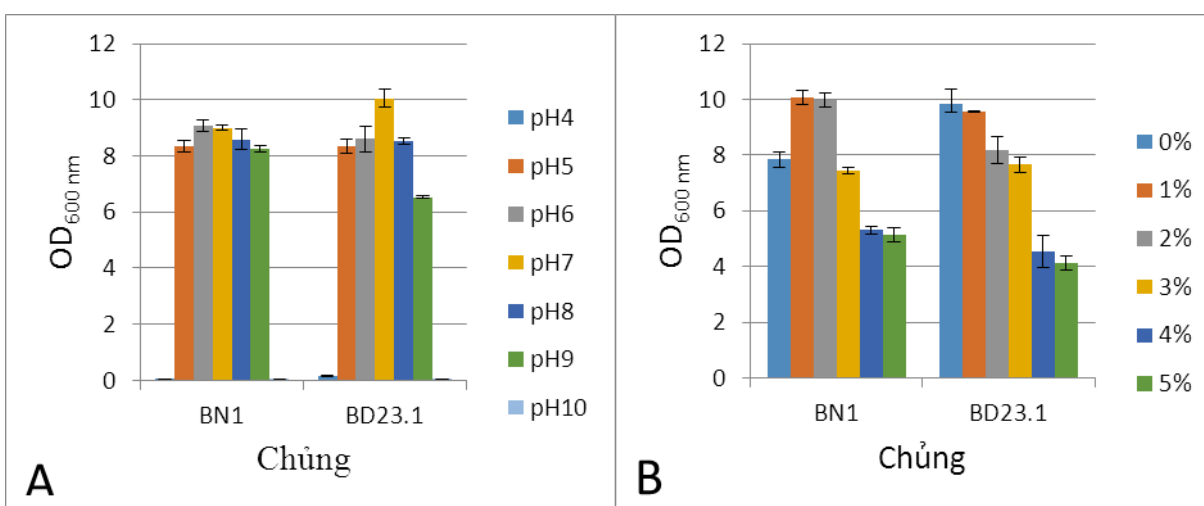
Chủng	Max score	Query Coverage	E-Value	Max Identities	Kết luận
BN1	2494	100%	0,0	100%	<i>B. subtilis</i>
BD23.1	2508	100%	0,0	100%	<i>B. subtilis</i>

Dựa trên kết quả phân tích trình tự vùng 16S RNA xác định được 2 chủng BN1 và B23.1 là chủng *B. subtilis*. So sánh giữa 2 chủng BN1 và BD32.1, chủng BN1 là chủng đối kháng với *V. parahaemolyticus* mạnh hơn. Còn chủng BD23.1 là chủng tiết enzyme ngoại bào mạnh hơn. Như vậy 2 chủng này nên được khảo sát tiếp theo để phối trộn trong chế phẩm vi sinh.

3.4. Đặc tính sinh trưởng của chủng

Khả năng chịu pH và chịu mặn: từ kết quả trên **Đồ thị 1** cho thấy 2 chủng BN1 và BD23.1 có khả năng chịu được pH từ 5 – 9, nồng độ muối từ 0 – 5%. Và ở pH 7, nồng độ muối từ 0 – 2% là điều kiện sinh trưởng tối ưu.

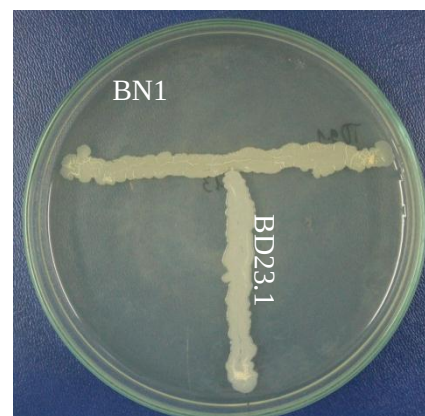
So sánh với khoảng pH trong điều kiện ao nuôi tôm nước lợ ở nước ta là 7,5 - 8,2 và nồng độ muối là 1,5 – 2,5 % [1], điều này cho thấy chủng BN1 và BD23.1 đều có khả năng chịu khoảng pH và nồng độ muối rộng phù hợp với điều kiện ao nuôi tôm nước ta, do đó, thích hợp để làm chế phẩm sinh học trong nuôi tôm. Kết quả này phù hợp với dự đoán vì các chủng vi sinh vật này được phân lập chính từ các ao nuôi tôm.



Đồ thị 1: OD_{600 nm} của hai chủng BN1 và BD23.1 ở các nồng độ pH (A) và nồng độ muối NaCl (B) khác nhau sau 18 giờ nuôi cấy.

Khả năng tương thích của hai chủng tuyển chọn: các chế phẩm sinh học thường được sử dụng dưới dạng hỗn hợp các chủng vi khuẩn nhằm ứng dụng toàn bộ các tiềm năng của từng chủng cũng như đảm bảo tính thích nghi và hiệu quả ở mọi điều kiện môi trường. Do đó, việc tiến hành kiểm tra tương thích giữa các chủng tuyển chọn nhằm có cơ sở phối trộn phù hợp. Phương pháp được tiến hành như đã mô tả ở phần trên. Kết quả thể hiện ở **Hình 6**.

Đường cấy hai chủng BN1 và BD23.1 mọc sát nhau chứng tỏ hai chủng có khả năng tương thích với nhau. Hai chủng BN1 và BD23.1 có khả



Hình 6: Sự tương thích giữa hai chủng BN1 và BD23.1 sau 18 giờ nuôi cấy.

năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* nhưng không kháng với nhau, chúng có khả năng tương thích với nhau nên chúng hoàn toàn có thể phối trộn với nhau trong chế phẩm.

4. Kết luận

Từ 70 chủng phân lập được trong các mẫu đất, mẫu nước, mẫu tôm thu được từ 31 ao nuôi tôm ở Bến Tre sàng lọc sơ bộ chọn được 61 chủng có các đặc điểm của *Bacillus*. Trong đó tuyển chọn được 17 chủng có khả năng sinh enzyme ngoại bào và khả năng kháng với *V. parahaemolyticus*. Riêng hai chủng BN1 và BD23.1 có khả năng kháng với *V. parahaemolyticus* và sinh enzyme mạnh nên được định danh và phân tích kết quả định danh cho thấy hai chủng này thuộc *B. subtilis*. Hai chủng BN1 và BD23.1 có đặc điểm sinh trưởng phù hợp với điều kiện nuôi tôm ở nước ta như khoảng chịu pH (5-9) và chịu mặn (0-5%) rộng, ngoài ra hai chủng này tương thích với nhau và đặc tính có lợi của từng chủng sẽ bổ sung cho nhau nên thích hợp cho ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh. Tuy chỉ là bước đầu nghiên cứu trong phòng thí nghiệm nhưng là nghiên cứu cơ bản có mang tính ứng dụng cụ thể cho điều kiện sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ trong nuôi tôm ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

- [1] Nguyễn Văn Hào (2014), Hướng dẫn quản lý chất lượng nước trong ao nuôi tôm sú.
- [2] Trần Linh Thuộc (2010), Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, Nxb Giáo Dục, Tp. HCM.
- [3] Phạm Văn Ty (2006), Công nghệ sinh học – công nghệ vi sinh và môi trường, NXB Giáo Dục, Tp.HCM., NXB giáo Dục, TPHCM.

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

- [4] Altan, A. (2004), Isolation and Molecular Characterization of Extracellular Lipase and Pectinase Producing Bacteria from Olive Oil Mills, *İzmir Institute of Technology*.
- [5] Arici, M., Bilgin, B., Sagdic, O. and Ozdemir, C. (2004), Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces, *Food Microbiology*, 21(1), 19–24.
- [6] Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J.L. (2006), The role of probiotics in aquaculture, *Veterinary microbiology*, 114(3-4), 173–186.

- [7] Balcázar, J.L. and Rojas-Luna, T. (2007), Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* Species Confers Protection Against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Current Microbiology*, 55(5), 409–412.
- [8] Chythanya, R., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. (2002), Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas*-2 strain, *Aquaculture*, 208(1), 1–10.
- [9] Mishra, V. and Prasad, D.N. (2005), Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109–115.
- [10] Purivirojkul, W., and Areechon, (2007), Application of *Bacillus* spp. isolated from intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*) from natural habita for control pathogenic bacteria in aquacult, *Kasetsart J. (Nat. Sci)*, 41, pp. 125-132.
- [11] Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. (2003), Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Letters in applied microbiology*, 36(2), 83–87.