

SÀNG LỌC VÀ NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHITINASE
CỦA CÁC CHỦNG *Bacillus thuringiensis* PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

**Isolation and Optimization Study Of antifungal Chitinase Biosynthesis of
Bacillus thuringiensis Strains Isolated in Viet Nam**

Trịnh Thị Thu Hà, Lê Thị Minh Thành, Lê Văn Trường, Mẫn Hồng Phượng,
Hoàng Thị Hồng Anh và Đồng Văn Quyền

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam

Ngày nhận bài: 04.12.2018

Ngày chấp nhận: 28.12.2018

Abstract

It has long been known that *Bacillus thuringiensis* (Bt) was successfully used for the control of insect pests. In addition, a research on the ability to produce abundant chitinolytic enzymes (chitinase) of *Bt* have been done. Chitinase produced by *Bt* can be applied in agriculture to control of fungal pathogens. In this study, 452 Bt strains isolated in the Northeast of Vietnam were screened for chitinase-producing strains, resulting in 107 strains (making up 23.67%). In 31 strains with the high chitinase activity, 22 strains (accounting for 70.97%) were selected and screened for genes encoding chitinase protein; they are studied about culture conditions which is influent to chitinase activity. The factors for chitinase biosynthesis of selected strain were optimized, including: substrate source as chitin at 0.5% concentration; Carbon source as corn flour; Nitrogen source: soybean meal; Medium pH at 7 and culture temperature at 28°C. In other hands, five strains releasing toxicity against pathogenic fungi *F. oxysporum* and *R. solani* were screened from 31 strains with antifungal ring diameters in the range 5 -13 mm. These strains will be a source of raw materials for research to develop bioproducts that use to control both insects and plant diseases in crops.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *chiA*, *chitinase*, *culture conditions*, *antifungal*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nguồn gen vi sinh vật nói chung, nguồn gen vi khuẩn *Bt* nói riêng có vai trò quan trọng trong chiến lược phát triển công nghệ sinh học. Vi khuẩn *Bt* được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực: nông - lâm nghiệp như sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, tạo giống cây trồng biến đổi gen có khả năng kháng sâu bệnh [3]; trong y tế như kiểm soát muỗi - vectơ truyền nhiều bệnh nguy hiểm (sốt rét, sốt xuất huyết, viêm não Nhật Bản, bệnh giun chỉ, bệnh sùi chân voi); môi trường (diệt ruồi tại các trang trại chăn nuôi gia súc, gia cầm)...

Bên cạnh việc sản sinh protein độc tố diệt côn trùng, trong quá trình sinh trưởng phát triển vi khuẩn *Bt* còn sản sinh một số chất chuyển hóa (trong đó có chitinase) và được xem là đối tượng có khả năng sinh chitinase rất phong phú. Chitinase có vai trò quan trọng trong đời sống cũng như trong nghiên cứu khoa học. Hiện nay, chitinase được ứng dụng chủ yếu trong sản xuất chitooligosaccharide, nano-chitin, N-acetyl D-glucosamine là những sản phẩm có giá trị kinh tế và ứng dụng cao, an toàn đối với con người, môi trường và được sử dụng trong nông nghiệp, thực phẩm và y dược. Ngoài ra, chitinase còn được sử dụng như thuốc trừ sâu sinh học trong nông nghiệp nhờ khả năng phân hủy cấu trúc chitin trong thành tế bào của nấm gây bệnh và côn trùng. Chitinase từ *Bt* có hiệu quả hơn chitinase từ *B. licheniformis* trong việc làm tăng tỉ lệ nảy mầm của hạt đậu lầy nhiễm nấm gây bệnh [4]. Các nhà khoa học Trung Quốc đã phân lập gen *chiA* mã hóa chitinase họ 18 từ chủng *B.*

thuringiensis YBT-9602, rồi gây đột biến gen ChiW50A, ChiW50A đột biến có tác động cộng hưởng đáng kể với các chế phẩm bào tử - tinh thể của *Bt* chống lại ấu trùng loài *Helicoverpa armigera* (thuộc Bộ cánh vẩy) và *Caenorhabditis elegans* (bộ Giun tròn) và ức chế sự phát triển một số nấm gây bệnh thực vật [5]. Gen *chiA* mã hóa endochitinase của chủng *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM- 2803 đã được tạo dòng và biểu hiện trong *E. coli*, enzym tái tổ hợp có tác dụng làm giảm sự tăng trưởng của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* – tác nhân gây bệnh thán thư ở thực vật [2].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành sàng lọc, tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bt* phân lập ở Việt Nam có khả năng sinh chitinase cao nhằm cung cấp nguồn nguyên liệu phục vụ cho các nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học *Bt* mới có tác dụng kép trong phòng trừ sâu - bệnh hại cây trồng hướng tới xây dựng một nền nông nghiệp sạch, bền vững tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Các chủng vi khuẩn *Bt* phân lập ở khu vực Đông Bắc Bộ Việt Nam trong bộ sưu tập *Bt* Việt Nam. Hai chủng vi nấm gây bệnh thực vật *F. oxysporum* và *R. solani* do Bộ môn Vi sinh – Học viện Nông nghiệp cung cấp.

Hóa chất: Chitin powder (Sigma), dung dịch Lugol 1%, N-acetyl D-glucosamine(Sigma), cao nấm men (Merk), peptone (Merk)...Thang DNA chuẩn (Thermo scientific, kích thước 10 kb). Cặp mồi chiF và chiR có trình tự sau:

chiF ATAGAATTCATGGCTATGAGGTCTCAAAA

chiR ATCTCGAGGTTTTTCGCTAATGACGGCATT.

2.2 Phương pháp

2.1.1. Sàng lọc hoạt tính thủy phân chitin

Hoạt tính thủy phân chitin được định tính theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Đĩa thạch chứa cơ chất chitin huyền phù 0,5% được đục lỗ đường kính 0,8 cm. Mỗi giếng nhỏ 100µl dịch enzym thô rồi để 2-3 tiếng ở 4°C để enzym khuếch tán vào thạch. Sau đó chuyển đĩa vào ủ 37°C, trong 14 – 16 giờ rồi lấy ra nhuộm bằng dung dịch 1% lugol. Đường kính vòng thủy phân được xác định bằng D – d (D:

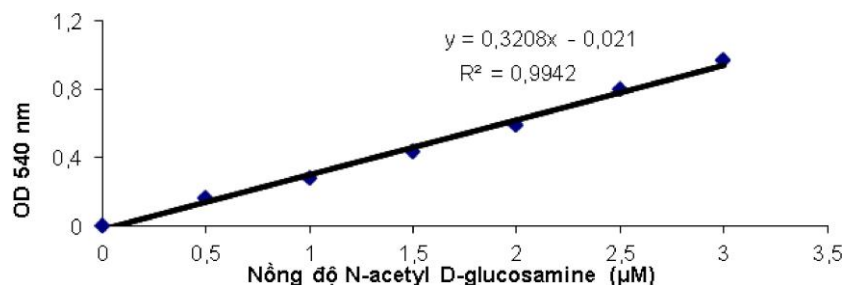
đường kính vòng ngoài vùng không bắt màu thuốc nhuộm, d: đường kính lỗ), thể hiện hoạt tính tương đối của enzym.

2.1.2. Xác định hoạt tính chitinase

Phản ứng gồm 0,5 ml dung dịch chitinase và 0,5 ml chitin huyền phù 1%, ủ ở 55°C trong 60 phút. Dừng phản ứng bằng cách đun cách thủy hỗn hợp trong 5 phút. Sau đó, ly tâm tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút rồi thu dịch. Lượng N-acetyl D-glucosamine được xác định dựa vào đồ thị chuẩn biểu diễn sự tương quan tuyến tính giữa hàm lượng N-acetyl D-

glucosamine và giá trị OD (Hình 1). Một đơn vị hoạt độ chitinase được xác định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1 μmol N-

acetyl D-glucosamine trong thời gian 1 phút ở 40°C và pH = 7.



Hình 1. Đồ thị chuẩn xác định hàm lượng N-acetyl D-glucosamine theo phương pháp Miller

2.1.3. Phương pháp PCR nhân gen *chiA*

PCR nhân đoạn mã hóa gen *chiA* được thực hiện trong hỗn hợp các thành phần gồm: 2 μl dNTPs; 2 μl buffer; 1 μl mỗi muối (10 pmol/ μl); 1 μl mỗi ngược (10 pmol/ μl); 1 μl glycerol; 1 μl DMSO; 0,3 μl Taq polymerase; 2 μl DNA; 9,7 μl nước cất đã loại ion và khử trùng, tổng thể tích 20 μl . Quá trình PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: biến tính: 94°C trong 2 phút, biến tính 94°C trong 30 giây, gắn mỗi: 60°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 1 phút 30 giây, lặp lại 30 chu kỳ từ bước 2, kéo dài ở 72°C trong 10 phút và kết thúc ở 4°C. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu *chiF* và *chiR* cho phản ứng nhân gen *chiA*.

2.1.4. Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy chủng *Bt* sinh tổng hợp chitinase

Điều kiện nuôi cấy các chủng *Bt* sinh tổng hợp chitinase (nguồn cơ chất, nồng độ cơ chất, nguồn các bon và ni tơ, pH môi trường, nhiệt độ nuôi cấy) được khảo sát lần lượt qua 6 thí nghiệm. Yếu tố khảo sát của thí nghiệm trước được dùng ngay cho thí nghiệm tiếp theo.

Nguồn cơ chất: Môi trường MTCS với pH= 7 ở nhiệt độ 28°C, bổ sung bột chitin (Sigma) đã được thủy phân thành dạng chitin huyền phù, chitin thô dạng vẩy từ vỏ tôm, vỏ cua với nồng độ 1%. Sau 96 giờ nuôi, thu dịch thô để xác định hoạt tính.

Nồng độ cơ chất: Môi trường MTCS với pH= 7 ở nhiệt độ 28°C, bổ sung chitin huyền phù ở các nồng độ: 0; 0,5; 1 và 1,5. Sau 96 giờ nuôi, thu dịch enzyme thô để xác định hoạt tính.

Nguồn các bon: Môi trường MTCS, với pH= 7 ở nhiệt độ 28°C, bổ sung chitin huyền phù nồng

độ 0,5%. Nguồn các bon: glucose, sacharose và bột ngô. Sau 96 giờ nuôi, thu dịch thô để xác định hoạt tính enzym.

Nguồn ni tơ: Môi trường MTCS (glucose được thay bằng bột ngô), với pH= 7 ở nhiệt độ 28°C, bổ sung chitin huyền phù nồng độ 0,5%. Cao nấm men được thay thế bằng các nguồn ni tơ khác: bột đậu tương, cao thịt và urê.

pH môi trường: Môi trường MTCS, với nhiệt độ 28°C, bổ sung chitin huyền phù 0,5%, pH môi trường là 6, 7 và 8. Sau 96 giờ nuôi, thu dịch enzym thô để xác định hoạt tính

Nhiệt độ nuôi cấy: Môi trường MTCS, pH7, bổ sung chitin huyền phù 0,5%, nuôi lác ở các nhiệt độ: 20, 28 và 37°C. Dịch enzym thô được thu sau 96 giờ nuôi để xác định hoạt tính.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sàng lọc hoạt tính thủy phân chitin của các chủng *Bt* phân lập

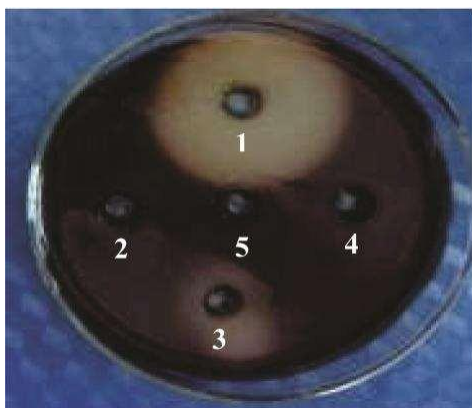
Từ 452 chủng vi khuẩn *Bt* phân lập ở các địa phương thuộc khu vực Đông Bắc Bộ, tiến hành sàng lọc khả năng sinh enzym thủy phân chitin trên môi trường thạch có bổ sung chitin. Kết quả thu được 107 chủng có khả năng thủy phân chitin (bảng 1). Trong đó, 31 chủng có đường kính vòng thủy phân lớn (từ 20 – 30 mm), số chủng có khả năng sinh chitinase chiếm tỉ lệ 23,67%; đây sẽ là nguồn nguyên liệu dồi dào cho khai thác và ứng dụng sản xuất chitinase. Kết quả này là phù hợp so với kết quả nghiên cứu của Shivalee [7], đường kính vòng thủy phân chitin lớn nhất của các chủng vi khuẩn phân lập từ đất là 30 mm.

Bảng 1. Kết quả sàng lọc hoạt tính thủy phân chitin của các chủng *Bt* phân lập

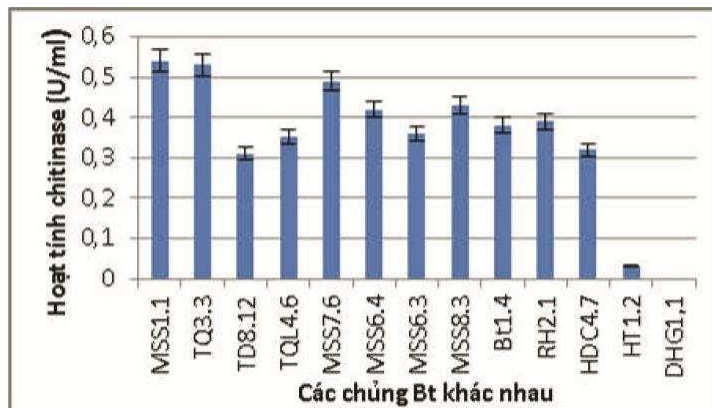
STT	Đường kính vòng thủy phân (D-d: mm)	Số chủng
1	0	345
2	1 – 10	42
3	11 – 19	34
4	20 - 29	30
5	≥ 30	1
Tổng số		452

Tiến hành xác định hoạt tính chitinase của 31 chủng *Bt* nói trên và 1 chủng *Bt* có đường kính vòng phân giải nhỏ nhất (3 mm: chủng HT1.2). Kết quả khảo sát cho thấy, chitinase từ chủng *Bt* MSS1.1 sinh ra là cao nhất (đạt 0,54 U/ml), tiếp theo là chủng TQ3.3 đạt 0,53 U/ml và thấp nhất là chủng HT1.2 phân lập ở Hòa Bình với hoạt tính chỉ đạt 0,03 U/ml (hình 2).

Trong kết quả này, hoạt tính chitinase của chủng *Bt* MSS1.1 là cao nhất, đạt 0,54 U/ml, cao hơn 2,3 lần so với chủng *Bt* được phân lập ở Pakistan (hoạt tính đạt 0,23 U/ml) [6]. Điều đó cho thấy, các chủng vi khuẩn *Bt* phân lập ở Việt Nam có tiềm năng lớn trong khai thác chitinase.



A

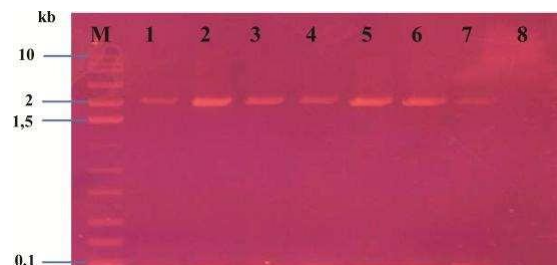


B

Hình 2. Sàng lọc hoạt tính thủy phân chitin của một số chủng *Bt* (A) Hoạt tính chitinase của 13 chủng *Bt* khác nhau. (B)
(1. MSS1.1; 2. HL2.3; 3. HT1.2; 4. DHG1.1; 5. ĐC)

3.2 Phân lập, sàng lọc gen *chiA*

DNA hệ gen của 31 chủng *Bt* có khả năng sinh chitinase đã được tách chiết và dùng làm khuôn để khuếch đại đoạn gen mã hóa protein ChiA bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu chiF và chiR. Kết quả cho thấy, đã khuếch đại được 22 đoạn gen *chiA* với kích thước khoảng 2 kb từ 22/31 chủng được lựa chọn (hình 3). Như vậy, số chủng mang gen *chiA* chiếm tỷ lệ tới 70,97%. Kết quả này làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo, đồng thời làm phong phú thêm cho Bộ Sưu tập nguồn gen chitinase của các chủng *Bt* Việt Nam, phục vụ cho nghiên cứu và ứng dụng sau này.



Hình 3. Kết quả sàng lọc gen *chiA* từ các chủng *Bt* có khả năng phân giải chitin: M. marker; 1- 8. thứ tự các chủng MSS1.1, TQ3.3, TD8.12, TQL4.6, MSS7.6, MSS6.4, Bt 1.4, DHG1.1.

3.3 Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy chủng *Bt* sinh tổng hợp chitinase

3.3.1. Nguồn cơ chất

Mỗi loài vi sinh vật thích hợp với một loại cơ chất chitin có nguồn gốc khác nhau, khi sử dụng nguồn cơ chất cảm ứng thích hợp với nồng độ tối ưu có thể khai thác tối đa khả năng sinh tổng hợp enzym thủy phân chitin của mỗi loài vi sinh vật. Khi sử dụng bột chitin làm cơ chất cảm ứng, hoạt độ chitinase do 31 chủng *Bt* sinh ra đều đạt mức độ cao hơn so với khi sử dụng cơ chất là vỏ tôm và vỏ cua (bảng 2). Như vậy, bột chitin là cơ chất thích hợp cho khả năng sinh chitinase của các chủng *Bt* đã lựa chọn.

3.3.2. Nồng độ cơ chất

Cơ chất chitin đóng vai trò như chất cảm ứng cho quá trình sinh tổng hợp enzym tương ứng. Khi sử dụng cơ chất chitin vào môi trường nuôi cấy sẽ tác động mạnh đến sinh trưởng và sinh tổng hợp chitinase của 31 chủng *Bt* lựa chọn. Kết quả thể hiện ở bảng 2 cho thấy, khi không có mặt chitin trong môi trường nuôi cấy, các chủng vi khuẩn *Bt* vẫn sinh tổng hợp chitinase nhưng hoạt độ rất thấp (< 0,1 U/ml). Khi bổ sung chitin với nồng độ 0,5% thì hoạt tính chitinase sinh ra cao nhất (đạt 0,52 - 0,70 U/ml).

Bảng 2. Hoạt độ chitinase (U/ml) của 31 chủng *Bt* khi sử dụng nguồn cơ chất và nồng độ cơ chất khác nhau

TT	Kí hiệu chủng	Nguồn cơ chất			Nồng độ cơ chất (%)			
		Bột chitin	Vỏ tôm	Vỏ cua	0	0,5	1	1,5
1.	DHG13.6	0,54	0,36	0,39	0,01	0,54	0,40	0,40
2.	DHG8.3	0,52	0,34	0,42	0,03	0,55	0,42	0,41
3.	DHG9.2	0,62	0,40	0,42	0,12	0,62	0,40	0,42
4.	DHG10.5	0,61	0,39	0,40	0,03	0,62	0,41	0,40
5.	MHY1.6	0,57	0,45	0,46	0,01	0,60	0,49	0,50
6.	MHY1.7	0,56	0,41	0,43	0,02	0,59	0,44	0,45
7.	MHY1.9	0,64	0,49	0,51	0,09	0,67	0,53	0,52
8.	MHY10.2	0,55	0,43	0,44	0,03	0,55	0,45	0,44
9.	MHY13.5	0,53	0,41	0,42	0,01	0,52	0,42	0,42
10.	MHY13.6	0,58	0,46	0,49	0,02	0,56	0,51	0,49
11.	MHY13.7	0,57	0,39	0,45	0,02	0,58	0,50	0,51
12.	MHY13.2	0,60	0,48	0,52	0,05	0,60	0,54	0,54
13.	TD3.18	0,57	0,41	0,50	0,01	0,59	0,50	0,50
14.	TD8.12	0,59	0,46	0,55	0,04	0,56	0,55	0,55
15.	HT2.2.6	0,58	0,48	0,48	0,11	0,60	0,49	0,48
16.	HT3.1.2	0,58	0,45	0,49	0,08	0,59	0,52	0,51
17.	HT2.2.2	0,55	0,37	0,48	0,03	0,57	0,50	0,48
18.	HT3.1.8	0,58	0,45	0,47	0,01	0,60	0,48	0,49
19.	HT3.2.5	0,59	0,44	0,50	0,00	0,59	0,52	0,51
20.	27.6TN	0,62	0,53	0,60	0,05	0,62	0,61	0,60
21.	11.1 TN	0,56	0,48	0,54	0,02	0,55	0,50	0,50
22.	TQ3.3	0,65	0,48	0,55	0,12	0,68	0,58	0,59
23.	TQL4.6	0,58	0,46	0,51	0,02	0,58	0,51	0,51
24.	<i>Bt</i> 1.4	0,60	0,47	0,50	0,02	0,61	0,51	0,50
25.	MSS1.1	0,67	0,47	0,52	0,14	0,70	0,55	0,55
26.	MSS7.6	0,56	0,42	0,56	0,03	0,59	0,56	0,56
27.	MSS6.4	0,60	0,41	0,46	0,01	0,60	0,50	0,46
28.	MSS6.3	0,59	0,50	0,52	0,01	0,61	0,54	0,53
29.	MSS8.3	0,61	0,51	0,53	0,02	0,62	0,53	0,53
30.	RH2.1	0,62	0,43	0,49	0,09	0,64	0,52	0,52
31.	HDC4.7	0,54	0,44	0,50	0,07	0,55	0,50	0,49

3.3.3. Nguồn các bon

Khi glucose trong môi trường cơ sở được thay thế bằng các nguồn các bon khác nhau thì chitinase sinh ra có hoạt tính khác nhau (Bảng 3). Trong môi trường sử dụng bột ngô làm nguồn các bon chính, hoạt tính chitinase đạt cao nhất (0,62 - 0,77 U/ml), cao hơn so với môi trường cơ sở ban đầu sử dụng glucose làm nguồn các bon (hoạt tính đạt 0,52 – 0,67 U/ml). Hoạt tính chitinase sinh ra thấp nhất (0,34 - 0,52 U/ml) trong môi trường có nguồn các bon là saccharose. Như vậy, nguồn các bon thích hợp nhất cho sinh tổng hợp chitinase của các chủng lựa chọn là bột ngô.

3.3.4. Nguồn ni tơ

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nguồn ni tơ thể hiện ở bảng 3 cho thấy, khi bột đậu tương được sử dụng làm nguồn ni tơ thì hoạt tính chitinase thu được cao nhất, đạt tới 0,62 – 0,79 U/ml. Khi sử dụng urea làm nguồn ni tơ thì hoạt tính chitinase thu được thấp nhất hơn, chỉ đạt 0,31 - 0,45 U/ml. Trong khi đó, hoạt tính chitinase của chủng nấm *Penicillium* sp. M4 đạt cao nhất khi môi trường được bổ sung urea [8]. Như vậy, có sự khác biệt về nhu cầu ni tơ giữa vi khuẩn *Bt* và nấm *Penicillium*.

Bảng 3. Hoạt độ chitinase (U/ml) của 31 chủng *Bt* khi sử dụng nguồn các bon và nguồn ni tơ khác nhau

TT	Kí hiệu chủng	Nguồn các bon			Nguồn ni tơ		
		Bột ngô	Glucose	Saccharose	Bột đậu tương	Urea	Cao thịt
1.	DHG13.6	0,63	0,55	0,37	0,67	0,35	0,57
2.	DHG8.3	0,62	0,52	0,40	0,65	0,32	0,56
3.	DHG9.2	0,72	0,61	0,43	0,73	0,37	0,62
4.	DHG10.5	0,70	0,63	0,46	0,73	0,41	0,60
5.	MHY1.6	0,68	0,60	0,47	0,70	0,45	0,61
6.	MHY1.7	0,67	0,59	0,45	0,69	0,40	0,60
7.	MHY1.9	0,74	0,63	0,52	0,77	0,43	0,64
8.	MHY10.2	0,63	0,55	0,44	0,68	0,35	0,55
9.	MHY13.5	0,60	0,53	0,42	0,62	0,33	0,52
10.	MHY13.6	0,65	0,60	0,46	0,66	0,41	0,59
11.	MHY13.7	0,68	0,59	0,41	0,69	0,40	0,58
12.	MHY13.2	0,70	0,61	0,52	0,70	0,44	0,58
13.	TD3.18	0,67	0,59	0,50	0,69	0,40	0,55
14.	TD8.12	0,69	0,62	0,45	0,69	0,35	0,53
15.	HT2.2.6	0,68	0,59	0,46	0,70	0,39	0,58
16.	HT3.1.2	0,71	0,58	0,46	0,71	0,40	0,61
17.	HT2.2.2	0,65	0,55	0,45	0,63	0,36	0,50
18.	HT3.1.8	0,68	0,60	0,45	0,69	0,37	0,60
19.	HT3.2.5	0,69	0,60	0,50	0,68	0,35	0,61
20.	27.6TN	0,72	0,64	0,50	0,70	0,42	0,61
21.	11.1 TN	0,64	0,56	0,47	0,65	0,30	0,60
22.	TQ3.3	0,75	0,66	0,51	0,78	0,37	0,69
23.	TQL4.6	0,68	0,60	0,45	0,71	0,34	0,63
24.	<i>Bt</i> 1.4	0,70	0,61	0,47	0,71	0,31	0,50
25.	MSS1.1	0,77	0,69	0,42	0,79	0,35	0,67
26.	MSS7.6	0,65	0,56	0,41	0,66	0,36	0,56
27.	MSS6.4	0,70	0,58	0,41	0,65	0,40	0,50
28.	MSS6.3	0,67	0,59	0,34	0,71	0,42	0,58
29.	MSS8.3	0,65	0,61	0,44	0,67	0,43	0,55
30.	RH2.1	0,64	0,62	0,39	0,67	0,32	0,52
31.	HDC4.7	0,64	0,56	0,40	0,65	0,40	0,51

3.3.5. pH môi trường

Mỗi loài vi sinh vật có một pH môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp chitinase. Ở các mức pH môi trường khảo sát, hoạt tính chitinase đạt cao nhất tại pH= 7 đạt 0,63 - 0,78 U/ml, ở pH= 6 và pH= 8 thì hoạt tính chitinase không có sự chênh lệch nhiều (bảng 4). Như vậy, pH môi trường thích hợp cho các chủng *Bt* lựa chọn sinh tổng hợp chitinase là 7. Đối với vi khuẩn *B. subtilis*, pH thích hợp cho sinh tổng hợp chitinase cũng ở mức pH= 7 [1].

3.3.6. Nhiệt độ thích hợp

Khi khảo sát nhiệt độ nuôi cấy các chủng vi khuẩn *Bt* lựa chọn ở các khoảng nhiệt độ 20, 28 và 37°C nhận thấy ở 28°C chitinase được tổng hợp mạnh nhất, hoạt tính đạt 0,62 – 0,79 U/ml), ở nhiệt độ 37°C thì hoạt tính thu được thấp nhất (0,36 – 0,60 U/ml) (bảng 4). Điều này hoàn toàn phù hợp vì 28°C là nhiệt độ thích hợp nhất cho sinh trưởng và phát triển của *Bt* và ở 37°C thì sự hình thành bào tử tăng lên.

Bảng 4. Hoạt độ chitinase (U/ml) của 31 chủng *Bt* khi được nuôi cấy ở pH và nhiệt độ khác nhau

TT	Kí hiệu chủng	pH môi trường			Nhiệt độ nuôi (°C)		
		6	7	8	20	28	37
1.	DHG13.6	0,53	0,65	0,55	0,54	0,66	0,37
2.	DHG8.3	0,51	0,66	0,53	0,54	0,68	0,36
3.	DHG9.2	0,49	0,74	0,54	0,52	0,74	0,43
4.	DHG10.5	0,55	0,74	0,61	0,60	0,73	0,51
5.	MHY1.6	0,52	0,68	0,55	0,55	0,69	0,50
6.	MHY1.7	0,53	0,71	0,58	0,60	0,71	0,48
7.	MHY1.9	0,59	0,78	0,62	0,66	0,79	0,54
8.	MHY10.2	0,50	0,66	0,54	0,55	0,67	0,45
9.	MHY13.5	0,46	0,63	0,45	0,47	0,63	0,42
10.	MHY13.6	0,48	0,64	0,48	0,49	0,66	0,37
11.	MHY13.7	0,52	0,65	0,57	0,56	0,64	0,47
12.	MHY13.2	0,54	0,72	0,58	0,60	0,72	0,44
13.	TD3.18	0,56	0,67	0,60	0,62	0,68	0,55
14.	TD8.12	0,50	0,71	0,55	0,58	0,70	0,43
15.	HT2.2.6	0,48	0,67	0,56	0,56	0,65	0,48
16.	HT3.1.2	0,49	0,72	0,55	0,54	0,71	0,42
17.	HT2.2.2	0,50	0,65	0,52	0,51	0,65	0,46
18.	HT3.1.8	0,47	0,65	0,54	0,54	0,66	0,45
19.	HT3.2.5	0,52	0,67	0,55	0,57	0,67	0,50
20.	27.6TN	0,53	0,73	0,52	0,53	0,71	0,47
21.	11.1 TN	0,51	0,64	0,51	0,52	0,64	0,50
22.	TQ3.3	0,64	0,78	0,67	0,66	0,79	0,60
23.	TQL4.6	0,54	0,72	0,55	0,58	0,70	0,50
24.	<i>Bt</i> 1.4	0,51	0,73	0,54	0,54	0,74	0,45
25.	MSS1.1	0,59	0,78	0,62	0,64	0,78	0,57
26.	MSS7.6	0,52	0,68	0,55	0,56	0,67	0,46
27.	MSS6.4	0,53	0,66	0,56	0,54	0,67	0,47
28.	MSS6.3	0,58	0,74	0,63	0,64	0,75	0,57
29.	MSS8.3	0,49	0,69	0,54	0,52	0,68	0,48
30.	RH2.1	0,57	0,66	0,59	0,60	0,69	0,53
31.	HDC4.7	0,50	0,64	0,55	0,59	0,62	0,51

Như vậy, môi trường thích hợp cho lên men sinh tổng hợp chitinase của các chủng *Bt* nghiên cứu có tỷ lệ thành phần (g/L) như sau: bột ngô là 10; K₂HPO₄ = 1; KH₂PO₄ = 1, bột đậu tương = 10; NaCl = 2; MgSO₄ = 0,5; CaCl₂ = 1; MnSO₄ = 0,01; ZnSO₄ = 0,01; FeSO₄ = 0,01; bổ sung chitin huyền phù 0,5% với pH = 7 và nhiệt độ nuôi nhân 28°C.

3.4 Khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật

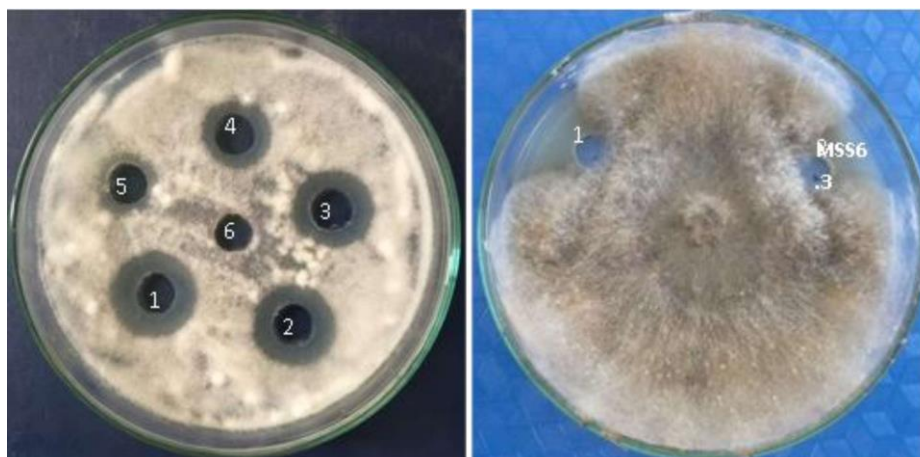
Từ 31 chủng có đường kính vòng thủy phân chitin lớn (20- 30 mm), tiến hành thử hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* và *R. solani*. Kết quả, xác định được 5 chủng có khả năng kháng nấm, trong đó 1 chủng kháng cả 2 loại nấm (chủng MSS1.1), 4 chủng chỉ kháng 1 loại nấm (TD8.12,

TQ3.3, MSS6.3 và MHY1.9) (bảng 5, hình 4). Trong đó, chủng *Bt* MSS1.1 có đường kính vòng ức chế đối với 2 loại nấm *F. oxysporum* và *R. solani* lần lượt là 13 và 8 mm.

Việc phát hiện ra khả năng kháng nấm của một số chủng *Bt* rất có ý nghĩa trong việc mở ra triển vọng phát triển *Bt* thành một loại thuốc trừ sâu sinh học có tác dụng bảo vệ kép (Dual control), vừa trừ sâu vừa chống bệnh cho cây trồng. Ở Việt Nam, đây là nghiên cứu đầu tiên về tác dụng kép của vi khuẩn *Bt* trong bảo vệ thực vật. Trên thế giới, ngoài các kết quả nghiên cứu về vi khuẩn *Bt* diệt côn trùng từ nhiều năm về trước, gần đây đã có công bố về tác dụng kháng nấm gây bệnh thực vật của chitinase từ *Bt*[2].

Bảng 5. Hoạt tính kháng nấm của các chủng *Bt* sinh chitinase

STT	Kí hiệu chủng	<i>Fusarium oxysporum</i> (D-d)mm	<i>Rhizoctonia solani</i> (D-d)mm
1.	MSS1.1	13	8
2.	TD8.12	8	-
3.	TQ3.3	5	-
4.	MSS6.3	-	7
5.	MHY1.9	5	-
6.	4D4 (chủng chuẩn)	12	-



Hình 4. Ảnh kháng nấm *F. oxysporum* (A) và *R. solani* (B) của các chủng *Bt*

4. KẾT LUẬN

Từ 452 chủng *Bt* phân lập ở Việt Nam đã sàng lọc được 5 chủng có khả năng sinh tổng hợp chitinase cao và có khả năng ức chế sinh trưởng của 2 loại nấm gây bệnh thực vật là *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani*, mở ra hướng nghiên cứu tạo chế phẩm *Bt* có

tác dụng kép trong phòng trừ sâu - bệnh hại cây trồng.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự trợ giúp kinh phí của đề tài cấp Viện Công nghệ sinh học: “Tạo bộ sưu tập các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có khả năng sinh chitinase khu vực Đông Bắc Bộ Việt Nam”, mã số CS18-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chauhan M and Singh P, 2013. *Production, optimization and characterization of chitinase enzym by Bacillus suBt ilis*. Res educ dev soc 1, 5-11
2. De la Fuente-Salcido NM, Casados-Vázquez LE, García-Pérez AP, Barboza-Pérez UE, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R, Garcia-Almendarez BE, Barboza-Corona JE, 2016 *The endochitinase ChiA Bt t of Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen Colletotrichum gloeosporioides*. Microbiology Open 5(5), 819–829.
3. George Z and Crickmore N, 2012. *Bacillus thuringiensis Applications in Agriculture-Bacillus thuringiensis Biotechnology*, Springer Science+Business Media, DOI 10.1007/978-94-007-3021-2_2.
4. Gomaa EZ, 2012. *Chitinase production by Bacillus thuringiensis and Bacillus licheniformis: their potential in antifungal biocontrol*. J Microbiol 50, 103-11
5. Ni H, Zeng S, Qin X, Sun X, Zhang S, Zhao X, Yu Z, Li L, 2015. *Molecular docking and site-directed mutagenesis of a Bacillus thuringiensischitinase to improve chitinolytic, synergistic Lepidopteran-larvicidal and Nematicidal activities*. Int J Biol Sci 11(3), 304-315
6. Saleem F, Younas A, Bashir R, Naz S, Munir N and Shakoori AR (2014) *Molecular cloning and characterization of exochitinase agene of indigenous Bacillus thuringiensis isolates*. Pakistan J Zool 46(6), 1491-1501.
7. Shivalee A, Divatar M, Sandhya G, Ahmed S, Lingappa K, 2016. *Isolation and screening of soil microbes for extracellular chitinase activity*. J Adv Sci Res 7(2), 10-14
8. Vu Thị Thanh, Vu Văn Hạnh, Nghiêm Ngọc Minh, Quyền Đình Thi, 2013. *Tối ưu hóa các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng nấm Penicillium sp. M4 phân lập từ ruộng mía*. Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2013. Nxb Khoa học tự nhiên và Công nghệ 1, 484-488.

Phản biện: PGS.TS. Lê Văn Trịnh