

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis* TỔNG HỢP ENZYM CHITINASE TỪ ĐẤT TRỒNG RAU TẠI XÃ BA BỂ, TỈNH THÁI NGUYÊN

Trần Văn Chí^{1,*}, Nguyễn Thanh Hải²

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: tranvanchi@tuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nhằm mục đích tuyển chọn chủng *Bacillus thuringiensis* (Bt) có hoạt tính chitinase cao và xác định một số điều kiện nuôi cấy phù hợp, nghiên cứu tập trung vào phân lập, tuyển chọn, định danh chủng Bt có hoạt tính phân giải chitin từ đất trồng rau tại xã Ba Bể, tỉnh Thái Nguyên và xác định điều kiện nuôi cấy phù hợp cho tổng hợp chitinase. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chitin với đường kính vòng phân giải đạt 0,54 - 2,35 cm và xác định được chủng BT-16 có hoạt độ chitinase mạnh nhất, đạt 1,52 U/mL. Từ kết quả nghiên cứu trình tự 16S rRNA, chủng BT-16 được định danh thuộc loài *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* và đặt tên là *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* BT-16. Chủng BT-16 có hoạt độ chitinase cao nhất, đạt 17,51 U/mL sau 3 ngày nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung 1,5% chitin, 0,5% galactose ở nhiệt độ 35°C và pH = 7,0. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng BT-16 có tiềm năng ứng dụng để sản xuất thuốc trừ sâu sinh học phục vụ sản xuất nông nghiệp an toàn và bền vững.

Từ khóa: *Bacillus thuringiensis*, chitinase, nhiệt độ, pH, nồng độ chitin, nồng độ galactose.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hàng năm, khoảng 35% năng suất cây trồng bị mất do dịch bệnh mà nguyên nhân chính của tổn thất này là do sâu hại [1], do đó kiểm soát sâu hại luôn rất được quan tâm. Theo Bùi Lan Anh và cs (2018) [2], cần thiết phải đẩy mạnh hơn nữa việc nghiên cứu và ứng dụng các chế phẩm sinh học để dần thay thế các tác nhân hóa học, vốn tiềm ẩn nguy cơ có tác động xấu đến sức khỏe con người, môi trường, cân bằng sinh thái và tăng khả năng kháng thuốc của sâu hại. Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* Bt được xem như là một loại thuốc trừ sâu sinh học có hiệu quả với mức độ an toàn cao [3] vì khả năng sản sinh nội độc tố [4, 5] làm chết sâu mà không ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và vật nuôi, đồng thời bảo vệ môi trường, giúp cân bằng sinh thái [6]. Trong quá trình gây độc và diệt sâu hại, để tạo điều kiện cho sự xâm nhập của tinh thể độc vào màng biểu mô, chitinase do Bt tổng hợp sẽ góp phần phân hủy hàng rào màng peritrophic (được cấu tạo bởi thành phần chính là chitin) [7]. Hơn nữa, khi chitin bị phân hủy, sâu hại có bề mặt bên ngoài chứa polyme này có thể bị tổn thương nghiêm trọng, thậm chí tử vong [8].

Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu về khả năng diệt sâu của vi khuẩn Bt, như công bố của Nguyễn Việt Phú và Trần Thanh Thủy (2013) [9] khi nghiên cứu 4 chủng vi khuẩn Bt về khả năng diệt sâu tơ, trong đó chủng P14 diệt được 100% số sâu sau 3 ngày nhiễm. Khả năng tổng hợp chitinase của vi khuẩn Bt, như công bố của Lê Thị Mai và cs (2020) [10] nghiên cứu về 4 chủng vi khuẩn Bt (T1-T4), theo đó, ở điều kiện nuôi cấy thích hợp, chủng T3 thể hiện đường kính vòng phân giải chitin cao nhất và đạt 21,1 mm. Do vậy, mục đích của nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn Bt bản địa có hoạt tính sinh chitinase cao làm tiền đề cho nghiên cứu tạo thuốc trừ sâu sinh học ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp tại khu vực miền núi phía Bắc.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là các mẫu đất trồng rau thu thập tại các xóm Hồng Thái, Nam Thái, Guộc, Soi Vàng và Y Na xã Ba Bể, tỉnh Thái Nguyên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn Bt phân giải chitin

Từ 15 mẫu đất trồng rau thu thập tại xã Ba Bể, tỉnh Thái Nguyên theo TCVN 7538 - 6:2010 [11], tiến hành phân lập vi khuẩn Bt theo phương pháp của Russell Travers và cs (1987) [12], 0,5 g mẫu đất được pha loãng bằng nước muối sinh lý đến 10^{-5} rồi ủ trong bể ổn nhiệt ở 80°C trong 3 phút để loại bỏ các tế bào sinh dưỡng. Hút 50 μ L dịch pha loãng cấy trải trên môi trường Luria Bertani (LB) bổ sung chitin với thành phần gồm: Tryptone 10 g/L, cao nấm men 5 g/L; NaCl 5 g/L; chitin 0,5%; agar: 15 g/L; pH = 7,0. Sau đó, chuyển đĩa vào ủ ở 30°C trong 24 giờ. Chọn khuẩn lạc mọc riêng rẽ, làm thuần và cấy chấm điểm trên môi trường LB bổ sung 0,5% dịch huyền phù chitin. Sau 3 ngày nuôi, xác định đường kính vòng phân giải chitin bằng cách nhuộm với dung dịch Lugol 1% [10]. Các chủng tạo vòng phân giải chitin được đánh giá đặc điểm tế bào, khuẩn lạc, tinh thể và bào tử thông qua nhuộm Gram, nhuộm Coomassie brilliant blue và soi trên kính hiển vi quang học có độ phóng đại 1000 lần.

2.2.2. Xác định hoạt tính enzyme chitinase

Hoạt tính của enzyme chitinase được xác định theo Jabeen và Qazi (2014) [13] và Farag và cs (2014) [14] cải tiến. Chủng tuyển chọn được nuôi trong môi trường dịch thể LB có bổ sung 0,5% chitin với tốc độ lắc 180 vòng/phút, ở 30°C. Sau 3 ngày nuôi, dịch lên men được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ sinh khối. 0,5 mL dịch nổi được trộn với 1 mL dịch huyền phù chứa 1% chitin, ủ trong 30 phút ở 40°C. Sau đó bổ sung 0,5 mL NaOH 1N vào hỗn hợp sau ủ, gia nhiệt đến 100°C và duy trì trong 3 phút để dừng phản ứng. Dịch sau phản ứng được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ cặn. Hút 0,5 mL dịch nổi cho vào ống nghiệm chứa 1,5 mL DNS (3,5 - dinitrosalicylic axit) đồng thời gia nhiệt đến 100°C, duy trì trong 5 phút rồi làm nguội nhanh xuống nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 535 nm. Căn cứ vào phương trình đường chuẩn của glucosamine - HCl có nồng độ từ 0 - 10 μ mol/mL bắt màu với thuốc thử DNS 1% tương ứng với giá trị OD ở bước sóng 535 nm có dạng $y = 0,139x + 0,0168$ ($R^2 = 0,995$) sẽ tính ra được lượng

glucosamine trong mẫu. Một đơn vị enzyme được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết xúc tác sự hình thành 1 μ mol glucosamine trong một phút ở pH = 7 và nhiệt độ 40°C.

2.2.3. Định danh chủng vi khuẩn tuyển chọn

Tách chiết ADN tổng số của sinh khối chủng vi khuẩn tuyển chọn theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [15]. Sử dụng cặp mồi 27F và 1492R [16] để nhân trình tự gen 16S rRNA. Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn được đọc trình tự thông qua hệ thống Applied Biosystems 3730 xl DNA analyzer sử dụng Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Macrogen, Hàn Quốc). Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn được so sánh với dữ liệu công bố trên EzTaxon [17]. Sơ đồ phả hệ của chủng tuyển chọn được xây dựng dựa vào trình tự gen 16S rRNA của chủng và các loài gần nhất thông qua phần mềm MEGA 7.0 [18].

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường và nhiệt độ nuôi đến hoạt tính chitinase của chủng tuyển chọn

Chủng tuyển chọn được nuôi cấy lắc, tốc độ 180 vòng/phút trong môi trường LB có bổ sung 0,5% chitin với pH môi trường từ 6,0 - 8,5 (bước nhảy 0,5); pH của môi trường nuôi cho hoạt tính chitinase của chủng tuyển chọn cao nhất được lựa chọn để tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi. Nhiệt độ nuôi được thiết kế từ 25 - 45°C, bước nhảy 5°C. Kết quả ở mức nhiệt độ cho hoạt tính chitinase cao nhất sẽ được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chitin trong môi trường đến hoạt tính chitinase của chủng tuyển chọn

Chủng tuyển chọn được nuôi trong môi trường LB có bổ sung từ 0,5 - 2,5% chitin, bước nhảy 0,5% trên máy lắc với tốc độ lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ và pH phù hợp đã được khảo sát ở trên. Sau 3 ngày nuôi, thu dịch lên men và xác định hoạt độ chitinase của chủng tuyển chọn trong môi trường nuôi cấy chứa các nồng độ chitin như mô tả ở trên.

2.2.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon bổ sung vào môi trường đến hoạt tính chitinase của chủng tuyển chọn

Sử dụng môi trường LB với các điều kiện thích hợp đã được khảo sát ở trên, đồng thời bổ

sung các nguồn carbon, gồm glucose, saccharose, lactose, galactose, tinh bột tan, carboxymethyl cellulose (CMC) với nồng độ 0,5%. Sau 3 ngày nuôi cấy, xác định hoạt tính chitinase của chủng tuyển chọn trong môi trường nuôi cấy chứa các nguồn carbon được bổ sung và lựa chọn nguồn carbon cho hoạt độ chitinase cao nhất.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các số liệu thu thập là đại diện của 3 thí nghiệm lặp lại. Kết quả thí nghiệm được

phân tích phương sai một nhân tố trên phần mềm JASP 0.19.3.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

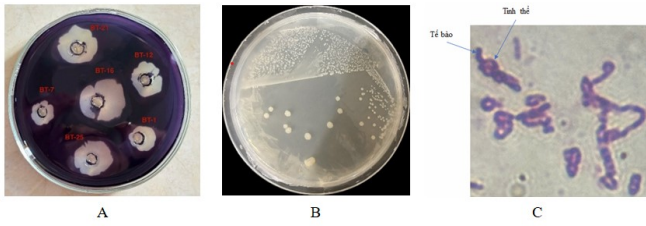
3.1. Phân lập chủng vi khuẩn Bt phân giải chitin

Từ 15 mẫu đất trồng rau tại xã Ba Bể, tỉnh Thái Nguyên, đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chitin và được mô tả chi tiết tại bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Đặc điểm của các chủng vi khuẩn phân giải chitin phân lập

TT	Ký hiệu chủng	Nguồn mẫu tại xã Ba Bể	Đặc điểm khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Gram	Đường kính vòng phân giải chitin (D - d), cm	Sinh tinh thể
1	BT-1	Nà Niềng	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt nhẵn, có rìa	Hình cầu xếp riêng rẽ	+	1,15 ^e ± 0,05	-
2	BT-7	Khuổi Luông	Tròn, màu trắng kem, bề mặt nhẵn, không rìa	Hình que xếp chuỗi	+	0,54 ^f ± 0,02	+
3	BT-12	Tọt Còn	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt bóng, không rìa	Hình que xếp riêng rẽ	+	1,42 ^d ± 0,03	+
4	BT-16	Pác Ngòi	Tròn, màu trắng kem, bề mặt bóng, không rìa	Hình que ngắn xếp chuỗi	+	2,35 ^a ± 0,05	+
5	BT-21	Đán Mây	Tròn, màu trắng kem, bề mặt nhẵn, có rìa	Hình que xếp riêng rẽ	+	1,72 ^c ± 0,09	-
6	BT-25	Khâu Ban	Tròn, màu trắng kem, bề mặt nhẵn khô, không rìa	Hình que xếp riêng rẽ	+	2,12 ^b ± 0,14	+

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số mũ giống nhau, thì không có sự khác nhau với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$; “+”: Gram dương/Sinh; “-”: Không sinh; “±”: Độ lệch chuẩn.



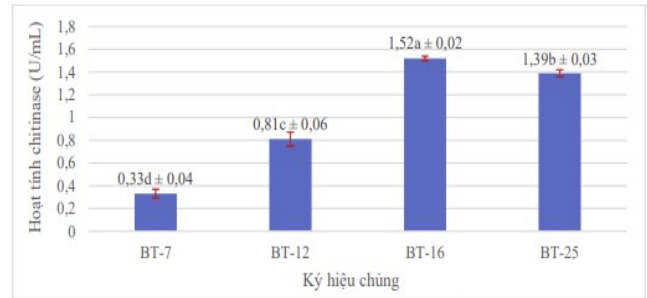
Hình 1. A - Khả năng phân giải chitin của 6 chủng mới phân lập được; B - Hình thái khuẩn lạc của chủng BT-16; C - Hình dạng tế bào và tinh thể của chủng BT-16

Thông tin từ bảng 1 và hình 1 cho thấy, trong 6 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chitin, có 4 chủng thuộc nhóm Gram dương, tế bào hình que, khuẩn lạc có dạng hình tròn, màu trắng kem hoặc trắng sữa, bề mặt bóng hoặc nhẵn, 4 chủng không có ria và tạo tinh thể độc. Đường kính vòng phân giải chitin của các chủng dao động 0,54 - 2,35 cm, trong đó, chủng BT - 16 tạo vòng phân giải chitin có đường kính lớn nhất đạt 2,35 cm. Các chủng sinh tinh thể gồm BT - 7, BT - 12, BT - 16 và BT - 25 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn Bt có hoạt tính chitinase cao

Kết quả đánh giá hoạt tính enzyme của 4 chủng Bt nghiên cứu thể hiện tại hình 2 cho thấy, các giá trị hoạt tính đều tuyến tính với đường kính vòng phân giải chitin đã trình bày ở bảng 1. Trong đó, chủng BT-16 có hoạt tính chitinase cao nhất, đạt 1,52 U/mL, cao hơn chủng Bt (MS3) được công bố bởi Kamil và cs (2007) [19] và tương đương với hoạt tính chitinase của chủng HP02 được Tran Thi Hong Hanh và cs (2020) [20] xác định đạt 1,47 U/mL. Theo Lê Thị Mai và cs (2020) [10], những chủng vi khuẩn Bt có

đường kính vòng phân giải chitin $\geq 2,0$ cm thì được xếp vào nhóm có hoạt tính chitinase mạnh. Chủng BT-16 sẽ được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Hoạt tính chitinase của 4 chủng vi khuẩn Bt nghiên cứu

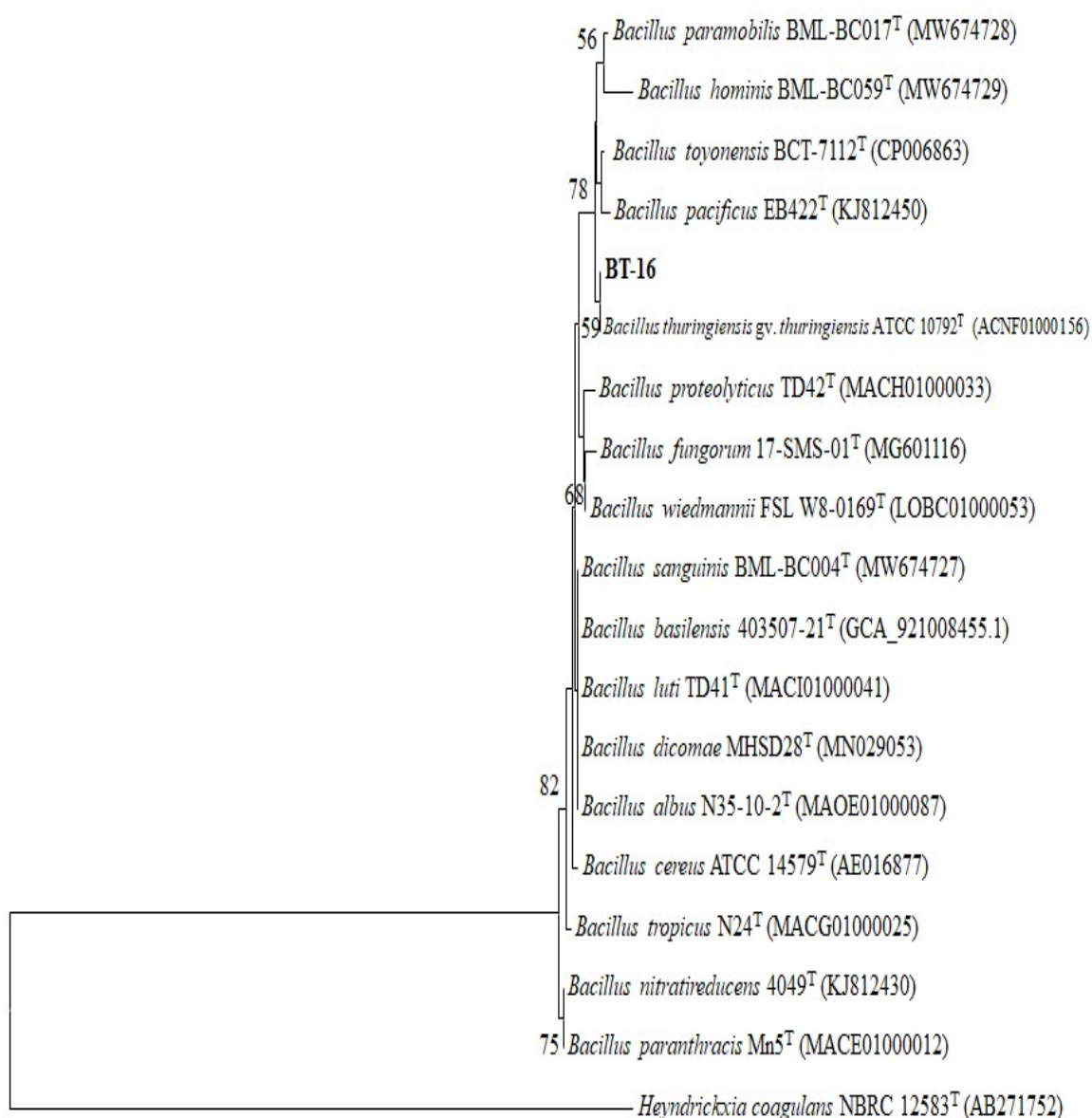
3.3. Định danh chủng BT-16

Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA (kích thước 1469 bp) của chủng BT-16 với dữ liệu loài chuẩn công bố trên EzBioCloud cho thấy chủng BT-16 thể hiện mức độ tương đồng cao nhất (100%) với *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* ATCC 10792^T (ACNF01000156), 99,18% với *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T (CP006863), 98,71% với *Bacillus paramobilis* BML-BC017^T (MW674728) và từ 96,84-98,64% với các loài khác thuộc chi *Bacillus* (Bảng 2). Sơ đồ phả hệ tại hình 3 cho thấy chủng BT-16 sắp xếp thuộc chi *Bacillus* và xếp cùng nhánh với *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* ATCC 10792^T (ACNF01000156). Vị trí của chủng BT-16 và *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* ATCC 10792^T khác biệt với các loài khác thuộc chi *Bacillus*. Từ dữ liệu phân tích trên, chủng BT-16 được xác định là *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* [21] và đặt tên là *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* BT-16.

Bảng 2. Trình tự gen 16S rRNA của chủng BT-16 được so sánh với các loài gần nhất

Loài gần nhất	Mức độ tương đồng (%)	Số nucleotide sai khác
<i>Bacillus thuringiensis</i> gv. <i>thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T (ACNF01000156)	100,00	0/1469
<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 ^T (CP006863)	99,18	12/1469
<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017 ^T (MW674728)	98,71	19/1469
<i>Bacillus pacificus</i> EB422 ^T (KJ812450)	98,64	20/1469
<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 ^T (MAOE01000087)	98,35	22/1469
<i>Bacillus luti</i> TD41 ^T (MACI01000041)	98,36	23/1469
<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 ^T (MW674727)	98,37	25/1460
<i>Bacillus dicomae</i> MHSD28 ^T (MN029053)	98,39	28/1469

Loài gần nhất	Mức độ tương đồng (%)	Số nucleotide sai khác
<i>Bacillus basilensis</i> 403507-21 ^T (GCA_921008455.1_1)	98,40	29/1458
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T (AE016877)	98,12	30/1469
<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 ^T (LOBC01000053)	97,75	33/1469
<i>Bacillus tropicus</i> N24 ^T (MACG01000025)	97,08	43/1469
<i>Bacillus hominis</i> BML-BC059 ^T (MW674729)	97,01	44/1469
<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 ^T (MACH01000033)	97,05	45/1469
<i>Bacillus paranthracis</i> Mn5 ^T (MACE01000012)	96,87	46/1469
<i>Bacillus nitratireducens</i> 4049 ^T (KJ812430)	96,86	47/1469
<i>Bacillus fungorum</i> 17-SMS-01 ^T (MG601116)	96,84	48/1469

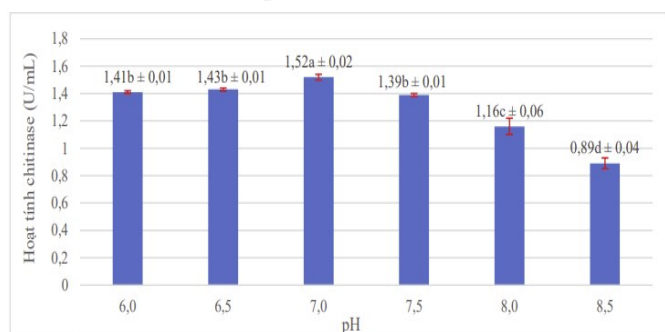


Hình 3. Sơ đồ phả hệ của BT-16 với các loài nhất nhất dựa vào trình tự gen 16S rRNA

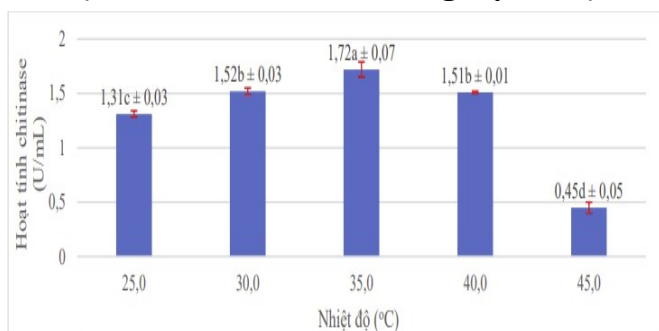
3.4. Ảnh hưởng của pH môi trường và nhiệt độ nuôi đến hoạt tính chitinase của BT-16

pH của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ một số ion và tính thấm của màng tế bào vi khuẩn, từ đó hỗ trợ sự phát triển của tế bào và sản xuất enzyme [20].

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường đến hoạt độ chitinase trình bày tại hình 4 cho thấy trong điều kiện pH = 7,0 chủng BT-16 có hoạt tính chitinase cao nhất đạt 1,52 U/ml tương đồng với một số kết quả nghiên cứu về pH thích hợp cho vi sinh vật tổng hợp chitinase. Đào Thị Mỹ Linh và cs (2022) [22] cho biết hoạt độ chitinase của nấm mốc *Aspergillus sydowii* cao nhất đạt 2,996 U/mL khi pH môi trường bằng 7,0. Công bố của Eman (2012) [23] về hoạt độ chitinase của *Bacillus thuringiensis* NM101-19 thể hiện mạnh nhất ở pH = 7,0 đạt 1,28 U/mL. Nawani và cs (2002) [24] báo cáo rằng hoạt độ chitinase của *Microbispora* sp. V2 đạt giá trị cao nhất khi nuôi cấy ở pH = 7,0.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH môi trường đến hoạt tính chitinase của chủng tuyển chọn



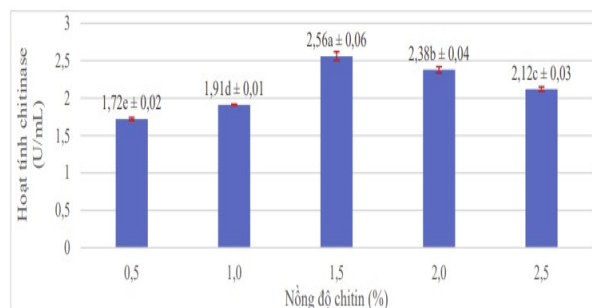
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi đến hoạt tính chitinase của chủng tuyển chọn.

Kết quả trình bày ở hình 5 về ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chitinase cho thấy, nhiệt độ 35°C thích hợp nuôi cấy chủng BT-16 để thu được chitinase cao nhất, đạt 1,72 U/mL, cao hơn so với công bố của Eman (2012) [23] khi nghiên

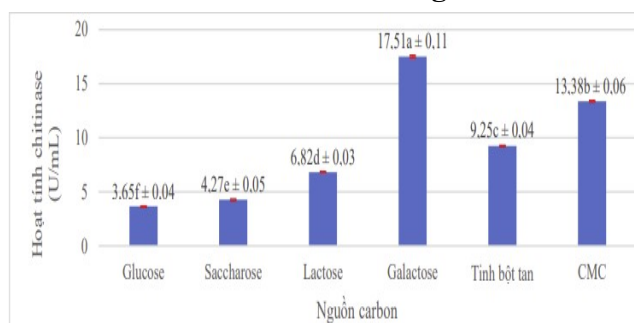
cứu chủng *Bacillus thuringiensis* NM101-19, theo đó hoạt tính chitinase thể hiện cao nhất khi nuôi cấy ở 30°C và thấp hơn so với công bố của Shanmugaiah và cs (2008) [25], theo đó chitinase do *Bacillus laterosporus* MML2270 tổng hợp đạt tối ưu ở nhiệt độ 40°C. Lý do có khác biệt về ảnh hưởng của nhiệt độ thích hợp đến hoạt tính chitinase có thể là do đặc điểm khác nhau của chủng giống nghiên cứu hoạt tính [26].

3.5. Ảnh hưởng của nồng độ chitin và nguồn carbon bổ sung trong môi trường đến hoạt tính chitinase của chủng BT-16

Nồng độ chitin là một yếu tố quan trọng vì nó có khả năng kích thích sản sinh chitinase ở một số vi sinh vật [27]. LB là môi trường nghèo nguồn dinh dưỡng carbon. Trong khi đó, một số nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng, việc bổ sung nguồn carbon đã giúp tăng cường hoạt tính chitinase của vi sinh vật [23, 27, 28]. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chitin và một số nguồn carbon bổ sung vào môi trường nuôi cấy chủng BT-16 thể hiện tại hình 6 và hình 7.



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ chitin đến hoạt tính chitinase của chủng BT-16



Hình 7. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến hoạt tính chitinase của chủng BT-1

Hoạt tính chitinase của chủng BT-16 tăng tỷ lệ thuận với nồng độ chitin được bổ sung vào môi trường (Hình 6), điều này chứng tỏ hầu hết hệ thống phân giải chitin của vi khuẩn đều có thể cảm

ứng [29]. Tuy nhiên, khi nồng độ chitin vượt ngưỡng 1,5% thì hoạt tính enzyme chitinase giảm. Điều này phù hợp với công bố của Gupta và cs (1995) [30] và Eman (2012) [23], khi báo cáo rằng hoạt tính chitinase của *Streptomyces viridificans* và *Bacillus thuringiensis* NM101-19 đạt tối ưu với môi trường được bổ sung 1,5% chitin. Nồng độ chitin 1,5% bổ sung trong môi trường sẽ được lựa chọn để đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon bổ sung đến hoạt tính chitinase của chủng tuyển chọn, kết quả được thể hiện tại hình 7.

Kết quả hình 7 cho thấy, nguồn carbon bổ sung vào môi trường giúp tăng cường hoạt tính chitinase của chủng BT-16 với mức độ khác nhau, trong đó, glucose tăng cường hoạt tính chitinase của BT-16 thấp nhất, đạt 3,65 U/mL và galactose cao nhất, đạt 17,51 U/mL. Hoạt tính chitinase của chủng BT-16 trong môi trường bổ sung galactose được tăng cường gấp hơn 7 lần so với môi trường không bổ sung và cao hơn những công thức còn lại ở mức có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cũng phù hợp với công bố của Eman (2012) [23] khi đánh giá ảnh hưởng của các nguồn carbon đến hoạt tính chitinase của hai chủng *Bacillus thuringiensis* NM101-19 và *Bacillus licheniformis* NM120-17, theo đó, trong các nguồn carbon được khảo sát, galactose là nguồn carbon phù hợp nhất để 2 chủng *Bacillus* nghiên cứu tăng cường hoạt tính chitinase lần lượt gấp từ 5 đến 8 lần so với đối chứng.

4. KẾT LUẬN

Từ 15 mẫu đất trồng rau tại xã Ba Bể, tỉnh Thái Nguyên đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chitin, trong đó chủng ký hiệu BT-16 sản sinh tinh thể độc, có đường kính vòng phân giải chitin đạt 2,35 cm và có hoạt tính chitinase đạt 1,52 U/mL. Chủng BT-16 được định danh thuộc loài *Bacillus thuringiensis* gv. *Thuringiensis* và được đặt tên là *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* BT-16. Chủng vi khuẩn BT-16 thể hiện hoạt tính chitinase cao nhất đạt 17,51 U/mL sau 3 ngày nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung 1,5 % chitin, 0,5 % galactose ở điều kiện nhiệt độ 35°C và pH là 7,0.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Oerke E. C., Dehne H. W., Schonbeck F., Weber A. (1994). Crop production and crop

protection: estimated losses in major food and cash crops. *Amsterdam, Netherlands: Elsevier*.

[2]. Bùi Lan Anh, Nguyễn Thế Hùng, Nguyễn Minh Tuấn (2018). Nghiên cứu sử dụng thuốc trừ sâu thảo mộc (ớt + tỏi + gừng) trong sản xuất rau cải bắp (*Brassica oleracea*) năm 2016 - 2017 tại Hà Giang. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 177(01): 221 - 226.

[3]. Xiaohong Pan, Tengzhou Huang, Yun Fang, Wenhua Rao, Xueping Guo, Danyue Nie, Dingyang Zhang, Fang Cao, Xiong Guan, Zhi Chen (2021). Effect of *Bacillus thuringiensis* biomass and insecticidal activity by cultivation with vegetable wastes. *Royal Society open science*, 8(3): 1 - 8. DOI: 10.1098/rsos.201564.

[4]. Karim Ennouri, Rayda Ben Ayed, Mohamed Ali Triki, Ennio Ottaviani, Maura Mazzarello, Fathi Hertelli, Nabil Zouari (2017). Multiple linear regression and artificial neural networks for delta-endotoxin and protease yields modelling of *Bacillus thuringiensis*. *3 Biotech*, 7(187): 1 - 13. DOI: 10.1007/s13205-017-0799-1.

[5]. Hongwei Sun, Xing Xiang, Qiao Li, Hui Lin, Xiaolin Wang, Jie Sun, Long Luo, Aiping Zheng (2021). Comparative genome analysis of *Bacillus thuringiensis* strain HD521 and HS18-1. *Scientific Reports*, 11: 1 - 13. DOI: 10.1038/s41598-021-96133-w.

[6]. Salma Mazid, Jogen Ch. Kalita, Ratul Ch. Rajkhowa (2011). A review on the use of biopesticides in insect pest management. *International Journal of Science and Advanced Technology*, 1(7): 169 - 178.

[7]. Xuezhi Ding, Zhaohui Luo, Liqiu Xia, Bida Gao, Yunjun Sun, Youming Zhang (2008). Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 56: 442 - 446. DOI:10.1007/s00284-008-9112-1.

[8]. Esteban A. Veliz, Pilar Martínez Hidalgo, Ann M. Hirsch (2017). Chitinase - producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*, 3(3): 689 - 705. DOI: 10.3934/microbiol.2017.3.689.

[9]. Nguyễn Việt Phú, Trần Thanh Thủy (2013). Phân lập, tuyển chọn chủng *Bacillus thuringiensis* từ rừng ngập mặn Cần Giờ có hoạt

tính diệt sâu. *Tạp chí Khoa học ĐHSP TP HCM*, 51: 49 - 58.

[10]. Lê Thị Mai, Lê Vũ Khánh Trang, Cáp Kim Cương, Lê Quang Trường, Nguyễn Thị Huyền Trang (2020). Nghiên cứu tuyển chọn và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp chitinase của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, 18(11): 56 - 61.

[11]. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 7538-6:2010 (2010). Phần 6: Hướng dẫn về thu thập, xử lý và bảo quản mẫu đất ở điều kiện hiếu khí để đánh giá các quá trình hoạt tính, sinh khối và tính đa dạng của vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.

[12]. Russell S. Travers, Phyllis A. W. Martin, Charles F. Reichelderfer (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6): 1263 - 1266.

[13]. Jabeen F., Qazi J. I. (2014). Isolation of chitinase yielding *Bacillus cereus* JF68 from soil employing an edible crab shell chitin. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 73: 771 - 776.

[14]. Farag A. M., Al - Nusarie, Taghreed S. (2014). Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*, 13(14): 1567 - 1578.

[15]. Sambrook J., Russell D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1 - 170.

[16]. Lane D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds). *John Wiley and Sons, New York*. 115 - 175.

[17]. Chun J., Lee JH., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B. K., Lim YW. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10): 2259 - 2261.

[18]. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870 - 1974.

[19]. Kamil Z., Rizk M., Saleh M., Moustafa M. (2007). Isolation and identification of

rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Global Journal of Molecular Sciences*, 2(2): 57 - 66.

[20]. Tran Thi Hong Hanh, Tran Thi Dao, Le Thi Ngoc An, Lam Thuong Thuong (2020). Isolation and selection of chitinase-producing bacteria with antifungal activity against *Fusarium oxysporum* from liliun rhizosphere soil. *Vietnam J. Agri.Sci*, 18(11): 965 - 975.

[21]. Browne H. P., Forster S. C., Anonye B. O., Kumar N., Neville B. A., Stares M. D., Goulding D., Lawley T. D. (2016). Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation,”. *Nature*, 533: 543 - 546.

[22]. Đào Thị Mỹ Linh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Bùi Thiên Kim Thu, Nguyễn Đình Triều Vũ, Nguyễn Đăng Khoa, Sơn Thiên Nga, Kiều Yên Vy, Trần Quỳnh Hoa (2022). Nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường nuôi cấy tới quá trình sinh chitinase từ nấm mốc (*Aspergillus sydowii*). *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 22(2): 52 - 62.

[23]. Eman Zakaria Gomaa (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *The Journal of Microbiology*, 50: 103 - 111. DOI: 10.1007/s12275-012-1343-y.

[24]. Nawani, N. N., Kapadnis, B. P., Das A. D., Rao A. S., Mahajan S. K. (2002). Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp.V2. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6): 965 - 975.

[25]. Shanmugaiah V., Mathivanan N., Balasubramanian N., Manoharan, P.T. (2008). Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology*, 7(15): 2562 - 2568.

[26]. Đặng Thị Thanh Tâm, Trần Thị Yến và Nguyễn Thanh Huyền. (2023). Đánh giá đặc điểm chủng vi khuẩn tiềm năng phân giải cellulose phân lập từ phụ phẩm chế biến gỗ. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 21(8): 1028 - 1036.

[27]. Souza R. F., Soares R. M., Nascimento R. P., Coelho R. R., Gomes R.C. (2005). Effect of different carbon sources on endochitinase

production by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Current Microbiology*, 51(1): 16 - 21. DOI: 10.1007/s00284-005-4506-9.

[28]. Taechowisan T., Peberdy J. F., Lumyong S. (2003). Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Annals of Microbiology*, 53: 447 - 461.

[29]. Joo J.G. (2005). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*, 27: 1483 - 1486.

[30]. Gupta R., Saxena R. K., Chaturvedi P., Viridi J. S. (1995). Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *Journal of Applied Microbiology*, 78(4): 378 - 383.

ISOLATION AND SELECTION OF *Bacillus thuringiensis* STRAINS PRODUCING CHITINASE FROM VEGETABLE SOIL IN BA BÈ COMMUNE, THAI NGUYEN PROVINCE

Tran Van Chi¹, Nguyen Thanh Hai²

¹University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyên University

²Vietnam National University of Agriculture

Abstract

With the aim of selecting *Bacillus thuringiensis* (Bt) strains exhibiting high chitinase activity and determining suitable culture conditions, this study focused on the isolation, selection, and identification of chitin-degrading Bt strains from vegetable-growing soils in Ba Bè commune, Thái Nguyên province, as well as on the determination of appropriate culture conditions for chitinase production. The results showed that six bacterial strains capable of chitin degradation were isolated, with clearance zone diameters ranging from 0.54 to 2.35 cm. Among them, strain BT-16 exhibited the highest chitinase activity, reaching 1.52 U/mL. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, strain BT-16 was identified as *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* and designated *Bacillus thuringiensis* gv. *thuringiensis* BT-16. Under optimal conditions - cultivation for 3 days in LB medium supplemented with 1.5% chitin and 0.5% galactose at 35°C and pH 7.0 - strain BT-16 achieved the highest chitinase activity of 17.51 U/mL. These findings suggest that strain BT-16 has strong potential for application in the production of biological pesticides, contributing to safe and sustainable agricultural production.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, chitinase, temperature, pH, chitin concentration, galactose concentration.

Ngày nhận bài: 23/12/2025

Ngày chuyển phản biện: 19/01/2026

Ngày thông qua phản biện: 3/02/2026

Ngày duyệt đăng: 6/3/2026